

AT

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 1 月 16 日 (16.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/004640 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q 1/68 久 (KOIZUMI, Katsuhisa) [JP/JP]; 〒357-0038 埼玉県飯能市仲町 12-10 Saitama (JP). 東敦 (AZUMA, Atsushi) [JP/JP]; 〒359-1141 埼玉県所沢市小手指町 1-11-12 Saitama (JP). 福島正和 (FUKUSHIMA, Masakazu) [JP/JP]; 〒357-0032 埼玉県飯能市本町 3-8 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/06754
- (22) 国際出願日: 2002 年 7 月 3 日 (03.07.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号共同ビル Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2001-204448 2001 年 7 月 5 日 (05.07.2001) JP (81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, US.
特願 2001-239181 2001 年 8 月 7 日 (07.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大鵬薬品工業株式会社 (TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8444 東京都千代田区神田錦町 1 丁目 2 番 Tokyo (JP). (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武知 貞士 (TAKECHI, Teiji) [JP/JP]; 〒359-1115 埼玉県所沢市御幸町 3-12 Saitama (JP). 小泉 克
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



(54) Title: DNA ARRAYS FOR MEASURING SENSITIVITY TO ANTICANCER AGENT

(54) 発明の名称: 抗癌剤感受性測定用 DNA アレイ

(57) Abstract: DNA arrays for measuring sensitivity to a metabolic antagonist-type anticancer agent or a combined use of such an anticancer agent with another anticancer agent, characterized by having at least 13 types of target gene fragments, involving respectively at least two types of genes selected from among nucleic acid metabolism-associated enzyme genes, gene repair-associated enzyme genes, drug tolerance-associated factor genes and housekeeping genes, wherein these gene fragments have been selected by the following steps 1) and 2) and immobilized on a substrate; 1) the step of selecting fragments having high specificity for target genes by searching the homology with the use of data base; and 2) the step of performing northern hybridization against RNA obtained from tumor cells with the use of the fragments selected in the step 1) as probes to thereby confirm the specificity for the target genes. Thus, expression of several ten to several hundred genes in a specimen can be conveniently measured by a single assay procedure at a high qualification level.

[続葉有]

WO 03/004640 A1

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

核酸代謝関連酵素遺伝子群、遺伝子修復関連酵素遺伝子群、薬剤耐性関連因子遺伝子群及びハウスキーピング遺伝子群の各群からの少なくとも2種以上を含む少なくとも13種以上の標的遺伝子の断片であって、

次のステップ1)及び2)、

1) データベースを利用したホモロジー検索により、標的遺伝子に特異性の高い断片を選択するステップ、

2) 1)のステップで選択された断片をプローブとして腫瘍細胞から得られたRNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行い、標的遺伝子に対する特異性を確認するステップ、

を行うことにより選択された断片を、基板上に固定化してなることを特徴とする代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性の測定用DNAアレイ。

検体中の数十～数百種の遺伝子発現を、一度だけの簡便なアッセイで定量性よく測定できる。

明 細 書

抗癌剤感受性測定用DNAアレイ

技術分野

本発明は抗癌剤感受性の測定用DNAアレイ及び当該DNAアレイを用いた抗癌剤感受性測定法に関する。

背景技術

一般的に、癌患者に対する抗癌剤の治療効果は必ずしも高いとは言えず、その一方で副作用は比較的高頻度に発現する。近年、抗癌剤の適正使用あるいは患者個人個人に応じたオーダーメイド医療が望まれている。すなわち、抗癌剤を投与する前に、患者から採取した組織検体等を測定対象試料とし、その抗癌剤の感受性に関連している遺伝子の発現量を測定することで、効果が期待できそうなまたは副作用が少なそうな患者を絞り込んで投与するというものである。

汎用されている抗癌剤のなかでも、5-フルオロウラシル（5-FU）系薬剤等の代謝拮抗剤の分野では適正使用を目指した臨床研究が盛んである。測定対象となる遺伝子としては、代謝拮抗剤の感受性に関連しているとされているチミジル酸シンターゼ（thymidylate synthase; EC2.1.1.45, 以下、TSと称する）、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（dihydropyrimidine dehydrogenase; EC1.3.1.2, 以下、DPDと称する）、チミジンホスホリラーゼ（thymidine phosphorylase; EC2.4.2.4, 以下、TPと称する）が代表的なものであり、それらの発現パターンは生化学的酵素活性測定法（Clinical Cancer Research, 5, 883-889, 1999）、抗体を用いた免疫学的測定法（癌と化学療法, 24(6): 705-712, 1997）ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR法によるmRNA測定法（Clinical Cancer Research, 6, 1322-1327, 2000）で解析され、適正使用の指標

とされている。また、シスプラチンを用いた癌の化学療法においてはE R C C 1等のDNA修復酵素も効果を予測する因子として有用であることが示唆されている(Journal of Clinical Oncology, 16, 309-316, 1998)。

一方、近年、数百～数万という多種の遺伝子のmRNA発現を同時に解析できる技術として、DNAマイクロアレイ法が汎用されるようになってきた。この手法は遺伝子を網羅的に解析するのに適しており、将来汎用抗癌剤の適正使用に応用されることが期待されている。

5-フルオロウラシル等の代謝拮抗剤は生体内で種々の過程を経て代謝されるため、代謝拮抗剤の感受性を予測するには、上記3種(TS, DPD及びTP)の遺伝子発現の解析だけでは十分とは言えない。更に広範囲の遺伝子発現を解析できれば感受性の予測率も高まると予想される。また実際の癌化学療法においては数種の抗癌剤を組み合わせた併用療法が施行されることが多いため、各薬剤の感受性に関与する遺伝子発現を包括的に解析できれば個々の患者に適した併用化学療法をデザインできる可能性がある。

生化学的酵素活性測定法、抗体を用いた免疫学的測定法、ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR法によるmRNA測定法はいずれも定量性は高いものの、原則として1遺伝子につき1回のアッセイが必要なので、多種の遺伝子発現様式を同時に解析するには作業上適していない技術である。

一方、DNAマイクロアレイ法は多種の遺伝子発現解析に適しているものの、定量性はノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR法に比べ格段に劣る。その原因の主たるものとして、ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR法は目的とする遺伝子に対する特異性をRNAやPCR産物のサイズにより分別することができるが、DNAマイクロアレイ法は分子サイズが表現されないドットプロットであるため特異性を分別できず、目的とする遺伝子発現以外の非特異的なシグナルを検出してしまう(いわゆるクロスハイブリダイゼーション)ことが挙げられる。目的とする遺伝子に対する特異性は、アレイ化する個々のDNA

断片（以下、ターゲット断片と呼ぶ）の設定法、すなわち遺伝子（全長cDNA）のどの部分（リージョン）をターゲット断片として選択するかによって左右される。通常のDNAマイクロアレイ法の場合、設計支援ソフトなどを利用して計算上特異性が高いと予想されるリージョン（データベース上に公開されている他の遺伝子と塩基配列の重複が少ないリージョン）を選択してターゲット断片としていたものの、その特異性が実証されているわけではない。また、ターゲット断片はPCRで増幅して調製されるが、その際に用いられる個々の遺伝子に特異的なプライマーがターゲット断片溶液に混入して一緒にアレイ化される結果、不均一なバックグラウンドの原因になることがある。これらの要因により、同一検体（生体由来試料）中のある特定遺伝子の発現量をDNAマイクロアレイ法で解析した結果とノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR法で解析した結果が食い違うことはしばしば起こるので、DNAマイクロアレイ法の結果のみで遺伝子発現に差があると断定することはできない。実験手順としては、第一次スクリーニングとして発現量に差がありそうな遺伝子をDNAマイクロアレイ法でおおまかに絞り込み、第二次スクリーニングとしてノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR法により発現量の差が確かであることを証明するのが一般的で、結局のところ少なくとも2種の測定法が必要となる。

従って、本発明の目的は代謝拮抗剤系抗癌剤及びこれと他の抗癌剤との併用療法に対する感受性を、一度だけの簡便なアッセイで、しかも高感度に定量性よく測定するための手段を提供することにある。

発明の開示

かかる実状において本発明者らは、汎用されているDNAマイクロアレイ法により一度で抗癌剤の感受性が測定できるか否かを検討した。しかし、次のような欠点があることが判明した。

すなわち、汎用されているDNAマイクロアレイ法の場合、対象とする遺伝子

の種類が数百から数万と多いために、現状で使用可能な抗癌剤の作用機序から推察して薬剤感受性には関連がないと思われる遺伝子を多数含んでいる。その結果、解析に余計な労力を必要としたり、抗癌剤の作用機序に密接した遺伝子を軽視することがあるといった短所が生ずる。

更に、汎用されているDNAマイクロアレイ法の場合、支持担体（ナイロンメンブレンやガラスプレートなど）にスポットするDNA量（濃度）は一定である場合が多く、抗癌剤の感受性に密接に関連している遺伝子であるにも関わらず発現量が極めて少ないために定量できないものがある。

そこで、本発明者らは、現存するDNAマイクロアレイ法を改良すべく検討した。まず、標的遺伝子を代謝拮抗剤系抗癌剤及びこれと併用する他の抗癌剤の作用機序に関連していると考えられる遺伝子を中心に数十から数百に絞り込んだ。次にデータベースを利用したホモロジー検索により計算上で設計しただけでなく、実際にノーザンハイブリダイゼーションにより特異性を確認したものをターゲット断片とした。かくして選択された断片を基板上に固定化することにより得られたDNAアレイは、代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性を、一度の試験で高感度に判定できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、核酸代謝関連酵素遺伝子群、遺伝子修復関連酵素遺伝子群、薬剤耐性関連因子遺伝子群及びハウスキーピング遺伝子群の各群からの少なくとも2種以上を含む少なくとも13種以上の標的遺伝子の断片であって、

次のステップ1) 及び2)、

- 1) データベースを利用したホモロジー検索により、標的遺伝子に特異性の高い断片を選択するステップ、
- 2) 1) のステップで選択された断片をプローブとして腫瘍細胞から得られたRNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行い、標的遺伝子に対する特異性を確認するステップ、

を行うことにより選択された断片を、基板上に固定化してなることを特徴とする代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性の測定用DNAアレイを提供するものである。

また、本発明は、このDNAアレイに、癌患者由来の体液検体又は組織検体から得られたmRNAを鋳型として合成した標識cDNAプローブをハイブリダイズさせることを特徴とする当該体液検体又は組織検体の代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性の測定方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、ユニバーサルプライマーの配列と、ターゲット断片が組み込まれたクロンの構造を示す図である。

図2は、プローブを合成するための鋳型となるDNAフラグメントを遺伝子の異なるリージョンから設定すると、特異性に差異がある場合があることを示すノーザンハイブリダイゼーションの画像の実例を示す図である。

図3は、ノーザンハイブリダイゼーションにおいて全RNA量と測定値の間の相関を示す図である。

図4は、本発明の診断判定力をノーザンハイブリダイゼーションと比較することで評価したことを示す図である。

図5は、11種のxenograftのTS-1に対する感受性と52種の遺伝子のうち相関関係の高かった4種の遺伝子発現量との相関を示す図である。

図6は、11種のxenograftのTS-1に対する感受性とTS発現量との相関を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のDNAアレイは、代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性の測定に用いるものである。ここで、代謝拮抗剤系抗癌剤

としては、テガフル、5-フルオロウラシル、テガフル・ウラシル、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム、カルモフル、カペシタビン、フルツロン等の5-フルオロウラシル系抗癌剤；6-メルカプトプリン、メルカプトプリンリボジド等のメルカプトプリン系抗癌剤；シタラビン、エノシタビン、ゲムシタビン等のシトシン系抗癌剤；メトトレキサート等が挙げられ、このうち5-フルオロウラシル系抗癌剤が特に好ましい。また、代謝拮抗剤と併用する他の抗癌剤としては、シスプラチン等の白金錯体系抗癌剤；CPT-11、VP-16等のトポイソメラーゼ阻害剤；ドセタキセル、パクリタキセル等のタキサン系抗癌剤等が挙げられる。

本発明における感受性の測定には、患者に対する抗癌剤の有効性及び副作用のバランスの判定、適切な併用療法の決定、適切な投与方法（投与量、投与スケジュール）の判定等が含まれる。

本発明における標的遺伝子は、感受性に関連していると考えられる遺伝子であり、核酸代謝関連酵素遺伝子群、遺伝子修復関連酵素遺伝子群、薬剤耐性関連因子遺伝子群及びハウスキーピング遺伝子群の各群からの少なくとも2種以上を含む少なくとも13種以上の遺伝子である。

ここで、核酸代謝関連酵素としては、チミジル酸シンターゼ（thymidylate synthase：TS）、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（dihydropyrimidine dehydrogenase：DPD）、オロテートホスホリボシルトランスフェラーゼ（orotate phosphoribosyltransferase：OPRT（ウリジンモノホスフェートシンセターゼ（uridine monophosphate synthetase：UMPS））、チミジンホスホリラーゼ（thymidine phosphorylase：TP）、チミジンキナーゼ1（thymidine kinase 1：TK1）、リボヌクレオシドージホスフェートリダクターゼM1サブユニット（ribonucleoside-diphosphate reductase M1 subunit：RRM1）、リボヌクレオシドージホスフェートリダクターゼM2サブユニット（ribonucleoside-diphosphate reductase M2 subunit：RRM2）、ウリジンシ

チジンキナーゼ2 (uridine cytidine kinase 2: UCK2)、ウリジンホスホリラーゼ (uridine phosphorylase: UP)、シチジンデアミナーゼ (cytidine deaminase: CDA)、5'ヌクレオチダーゼ (5' nucleotidase: NT5)、IMPデヒドロゲナーゼ1 (IMP dehydrogenase 1: IMPD)、メチレンテトラヒドロフォレートデヒドロゲナーゼ (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase: MTHFD1)、RNAポリメラーゼ2 (RNA polymerase 2: RP2)、ウリジンモノホスフェートキナーゼ (uridine monophosphate kinase: UMPK)、CTPシンターゼ (CTP synthase: CTPS)、デオキシシチジレートデアミナーゼ (deoxycytidylate deaminase: DCD)、デオキシシチジンキナーゼ (deoxycytidine kinase: DCK)、ホスホリボシルピロホスフェートシンセターゼ (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase: PRPS)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1: HPR1)、フォルリルポリグルタメートシンセターゼ (folylpolyglutamate synthetase: FPGS)、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼA (nucleoside diphosphate kinase A: NDKA)、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼB (nucleoside diphosphate kinase B: NDKB)、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (adenine phosphoribosyltransferase: APT)、アデノシンキナーゼ (adenosine kinase: AK) 等が挙げられる。これらの酵素遺伝子のうち、少なくともTS、DPD、ORRT、TP及びTK1の遺伝子を含むのが特に好ましい。

遺伝子修復関連酵素としては、DNA切除修復蛋白ERCC1 (DNA excisionrepair protein ERCC1: ERCC1)、ウラシル-DNAグリコシラーゼ (uracil-DNA glycosylase: UDG)、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ (poly(ADP-ribose) polymerase: PARP)、DNAリガーゼI (DNA ligase I: LIG1)、DNAリガーゼIII (DNA ligase III: LIG3)、DNAリガーゼIV (DNA ligase IV: LIG4)、DNAポリメラーゼβ (DNA

polymerase β : POLB)、DNAポリメラーゼ δ (DNA polymerase δ : POLD)、DNA-修復蛋白XRCC1 (DNA-repair protein XRCC1 : XRCC1) 等が挙げられる。これらの酵素遺伝子のうち、少なくともXRCC1及びUDGを含むのが好ましい。

薬剤耐性関連因子としては、トポイソメラーゼ1 (topoisomerase 1 : TOP1)、P-グリコプロテイン (P-glycoprotein : MDR1)、平衡ヌクレオシドトランスポーター1 (equilibrative nucleoside transporter 1 : ENT1)、多剤耐性関連蛋白1 (multidrug resistance-associated protein 1 : MRP1)、トポイソメラーゼ2 α (topoisomerase 2 α : TOP2A)、トポイソメラーゼ2 β (topoisomerase 2 β : TOP2B)、熱ショック蛋白27 (heat shockprotein 27 : Hsp27)、平衡ヌクレオシドトランスポーター2 (equilibrative nucleoside transporter 2 : ENT2) 等が挙げられる。これらの因子遺伝子のうち少なくともTOP1、MDR1、ENT1及びMRP1の遺伝子を含むのが好ましい。

ハウスキーピング遺伝子としては、グリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : GAPDH)、 β アクチン (β -actin : ACTB) 及び40Sリボソーマル蛋白S9 (40S ribosomal protein S9 : RSP9) 等が挙げられる。GAPDH、ACTB、RSP9から選ばれる2種以上を含むのが好ましい。これらの遺伝子は、内部標準として使用されるものである。

その他の遺伝子としては、E2F1、p53、VEGF β (VEGF β)、インテグリン α 3 (integrin α 3)、Mn SOD、Cu/Zn SOD、増殖細胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen:PCNA) 等が挙げられる。

これらの標的遺伝子の断片をすべて固定化するのが望ましいが、特に、TS、DPD、OPRT、TP、TK1、XRCC1、UDG、TOP1、MDR1、ENT1及びMRP1の11種の遺伝子と、GAPDH、ACTB及びRSP9

のうちの2種以上との合計の13種以上の遺伝子の断片を固定化すると前記感受性のより効率的な測定が可能であり好ましい。

これらの標的遺伝子の配列について、まずデータベースを利用したホモロジー検索により、各標的遺伝子に特異性の高い断片を選択する（ステップ1）。

このホモロジー検索は、例えばBlast Search等により行うことができる。断片の設計条件としては、例えばGC含量が40～60%で重複配列が少なく、Tm値が75～85℃、サイズ200～600bp等が挙げられる。

次にステップ1で設計された断片をプローブとして腫瘍細胞から得られたRNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、特異性を確認する（ステップ2）。ステップ1で設計された断片は、計算上は標的遺伝子に対する特異性が高いはずであるが、実際にはクロスハイブリダイゼーションが高い確率で起こる。実際、ステップ1で第1選択された断片が、ステップ2で特異的であることが確認できたものは10～20%にすぎない。

ステップ2は、まず、cDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて増幅することによりDNA断片を得る。次に、このDNA断片を鋳型として放射性プローブを酵素的に合成し、種々の腫瘍細胞から調製した全RNAをプロットしたメンブレンを用いてノーザンハイブリダイゼーションを実施し、特異性を確認する。すなわち特定遺伝子から転写されるmRNAのサイズ（文献情報やデータベースサーチにて調査できる）に対応したシグナルが検出され、しかも他のサイズのシグナルがほとんど検出されない（クロスハイブリダイゼーションがほとんどない）ことが特異性の条件となる。

特異性が充分でないDNA断片については、対応する遺伝子の他のリージョンからDNA断片を設計し直し、再度ノーザンハイブリダイゼーションを実施する。このような作業を特異性が充分になるまで繰り返すことで、アレイ化するDNA断片のリージョンを最適化し、ターゲット断片を得る。ターゲット断片は、プラスミド（pCR2.1-TOPO）にクローニングする。

なお、ターゲット断片をPCRで増幅する時に用いるプライマーとして、クローニングベクターのマルチプルクローニングサイトの配列を元にユニバーサルプライマーを設計し、すべてのターゲット断片が一組のユニバーサルプライマーで増幅できるようにする。当該ユニバーサルプライマーとしては、配列番号1及び2に示される塩基配列を有するプライマーが特に好ましい。また、スポッティング溶液に混入するプライマー量ができるだけ少なくなるようにユニバーサルプライマーの量を最適化する。その結果、すべてのターゲット断片のスポットにおけるバックグラウンドが低く抑えられ、ばらつきが少なくなる。

かくして選択された各標的遺伝子のターゲット断片を基板（支持担体）上に固定化すれば、本発明のDNAアレイが得られる。ここで使用される基板としては、通常公知のものが挙げられ、例えば、ガラスプレート、プラスチックプレート、メンブレン（ナイロン製等）、ビーズ等が挙げられ、好ましくはガラスプレートである。また、当該アレイへの断片の固定化は、通常公知のスポッティング手段が利用でき、例えば、特表平10-503841号公報記載のようなターゲットDNAを含む溶液に先の割れたピンを浸して支持体の上に圧着することにより移していく表面接着方式（stanford方式）、ターゲットDNAを含む溶液をインクジェットプリンタと同様の原理で支持体に吹き付けるインクジェット・圧電放出方式、光リソグラフィの技術を利用して、ターゲットDNAを直接支持体の上で合成する光リソグラフィ方式等により行われ、好ましくはstanford方式である。

ノーザンハイブリダイゼーションによる解析で得られた個々の遺伝子の発現量に基づいて、発現量の多い遺伝子については基板（支持担体）に固定化するターゲット断片の量を少なく、発現量の少ない遺伝子については多くすることにより、すべての標的遺伝子のmRNAを定量できるようにするのが好ましい。

得られた本発明のDNAアレイを用いて前記抗癌剤の感受性を測定するには、当該DNAアレイに、癌患者由来の体液検体又は組織検体から得られたmRNAを鋳型として合成した標識cDNAプローブをハイブリダイズさせることにより

実施できる。

ここで癌患者由来の体液としては、血液、尿等が挙げられる。また組織としては、癌組織が挙げられる。検体からmRNAの採取は常法により行われ、mRNAは全RNAに含まれたままでも、全RNAから単離したもののいずれでもよい。また標識cDNAは、mRNAを鋳型として逆転写酵素反応を利用して標識する。ここで、標識としては、蛍光標識、放射性同位体による標識が挙げられるが、蛍光標識が特に好ましい。

ハイブリダイゼーションの条件は、常法により行うことができる。ハイブリダイズの定量は標識プローブ量、例えば蛍光量を定量することにより行われる。

本発明DNAアレイの定量性のバリデーションを取るために、52種の遺伝子発現の測定値をノーザンハイブリダイゼーション法で得られた測定値と比較したところ、食い違うことがほとんどなかった。また、特徴のある発現様式を示す（平均的な発現量よりも2倍以上差のある）遺伝子を判別することも、ノーザンハイブリダイゼーションと同程度の精度で可能であった。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの範囲に限定されるものではない。

実施例 1

(1) ターゲット断片の調製

A. DNA断片の選択と設計

後記表2及び3に示すように、核酸代謝関連遺伝子を中心に、5-FUの感受性に関連していると考えられる遺伝子を52種類選択した。DNA断片の設計は、原則としてGC含量が40～60%で重複配列が少なくTm値が75～85℃、サイズが200～600bpであることを条件とし、クロスハイブリダイゼーションをできるだけ回避するために他の遺伝子と重複する配列がほとんどないことをデータベースを利用したホモロジー検索(Blast Search)により確認した。PCR

で増幅する時に用いる個々の遺伝子に特異的なプライマー (specific primer [forward/reverse]) は T_m 値が $59 \sim 61^\circ\text{C}$ となるように設計支援ソフト (Primer Express™、PE バイオシステムズ) を用いて設定した。

B. DNA断片の合成と精製

DNA断片は、ヒト由来の cDNA ライブラリーを鋳型として、特異的プライマーと ExTaq™ (TaKaRa) を用いて PCR 反応 (熱変性を 94°C で 1 分, アニールを 60°C で 1 分, 伸長反応を 72°C で 1 分を 1 サイクルとして、計 30 サイクル) により増幅した。PCR 産物溶液をスピンカラム (ミニプレップスピンカラム、Aetna) により精製し、蒸留水で溶出した。

(2) ノーザンハイブリダイゼーション

A. 全RNAの調製と精製

表 1 記載の 14 種のヒト腫瘍細胞から RNeasy midi kit™ (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出し、蒸留水で溶出した。溶液中に混在している可能性のある DNA を DNase を用いて分解し (37°C 、30 分)、フェノール・クロロホルムを用いて除タンパクし、エタノール沈殿により精製・濃縮し、蒸留水に溶解して全 RNA 溶液を得た。

表 1

	癌種	細胞株
1	ヒト胃癌	NUGC-3
2	ヒト胃癌(FU耐性)	NUGC-3/FU
3	ヒト大腸癌	DLD-1
4	ヒト大腸癌(FU耐性)	DLD-1/FU
5	ヒト大腸癌(FdUrd耐性)	DLD-1/FdUrd
6	ヒト大腸癌(F3dThd耐性)	DLD-1/F3dThd
7	ヒト線維肉腫	HT1080
8	ヒト線維肉腫(EUrd耐性)	HT1080/EUrd
9	ヒト膀胱癌	MIAPaCa-2
10	ヒト大腸癌	KM-12C
11	ヒト肺癌	A549
12	ヒト乳癌	MCF-7
13	ヒト頭頸部癌	KB
14	ヒト卵巣癌	TYK-nu

B. ノーザンブロット

前記の14種のヒト腫瘍細胞から調製した全RNA(各5 μ g)を1重量%変性アガロースゲルにて電気泳動した。臭化エチジウムにより染色し、紫外線下で写真撮影してRNAが分解していないことを確認した。ゲル中のRNAをキャピラリー法によりナイロンメンブレンにブロットし、紫外線によりメンブレンに固定(クロスリンク)した。

C. プロープの調製

上記(1)で調製したDNA断片を鋳型として、ランダムプライム法(rediprime™II、アマシャムファルマシア)により[α - 32 P] dCTPにてラベルしたプロープを合成した。プロープ中に取り込まれなかった[α - 32 P] dCTPをゲル濾過法(ProbeQuant™ G-50マイクロスピカラム、アマシャムファルマシア)により取り除いた。

D. ノーザンハイブリダイゼーション

上記(2)Bと(2)Cで調製されたブロットとプロープを用いてノーザンハイブリダイゼーションを実施した。ブロットをハイブリダイゼーションバッファ

ー（ラピッドハイブリパッファー、アマシャムファルマシア）中にて65℃、30分プレハイブリダイズし、そこに熱変性させたプローブを添加して、65℃で2時間ハイブリダイズした。次にプロットを洗浄し（0.1重量% SDSを含む2×SSC（0.15mol/L NaCl/0.15mol/Lクエン酸3ナトリウム）溶液で2回、0.1重量% SDSを含む1×SSC溶液で1回、0.1重量% SDSを含む0.1×SSC溶液で2回）、遮光下で一晩イメージングプレート（富士フィルム）に露光した。翌日、イメージングプレートを画像解析装置（STORM、Molecular Dynamics Inc.）でスキャンし、画像データを保存した。

E. DNA断片の評価と再設計

ノーザンハイブリダイゼーションの画像を見て、DNA断片の特異性を評価した。すなわち、目的とする遺伝子のmRNAと同じサイズのシグナルが見られ、それ以外のシグナルがほとんど見られないときには特異性があるものと判断し、対して目的とする遺伝子のmRNAのサイズにシグナルが認められなかったり、他のシグナルが認められた（クロスハイブリダイゼーション）時には特異性に乏しいと評価した。後者の場合、同一遺伝子のmRNAの他のリージョンから上記（1）Aに示した条件でDNA断片を再設計した。以下、DNA断片の特異性が確認されるまで、設計、合成及びノーザンハイブリダイゼーションの工程を繰り返す（多いもので6回）、ターゲット断片（本発明のDNAアレイに乗せる遺伝子のリージョン）を決定した。

（3）DNAアレイの作成とハイブリダイゼーション

一連の工程は、Stanford方式を基本としており、一部改変したものである。

A. ターゲット断片のクローニング

ターゲット断片を質・量ともに安定に供給するには、ロットによるばらつきが生じ易いcDNAライブラリーを鋳型として用いるのは望ましくない。そこで、図1で示すように、個々のターゲット断片（PCR産物の状態にある）をTAク

- ローニング法によりプラスミド (pCR-TOPO vector, Invitrogen) にクローニングすることにより、すべてのターゲット断片に対応した52種類のクローンを得た。

B. ターゲット断片の調製

上記のクローンを鋳型とし、上記(1)に準じた方法でターゲット断片を増幅した。ただし、プライマーとしてユニバーサルプライマーを用いた(配列番号1、2)。得られたPCR産物をエタノール沈殿法により洗浄した後、蒸留水で溶かした。溶液の一部を取って濃度算出(吸光度測定による)及び純度検定(アガロースゲル電気泳動による)に用いた。ターゲット断片溶液は一度室温真空下で乾固し、Micro Spotting Solution(BM)にて0.5-10 pmol/ μ Lの濃度になるように溶解した(表2及び3に個々のターゲット断片の濃度を示す)。得られたターゲット断片の塩基配列を配列番号3~配列番号54に示した。

表 2

遺伝子名	略称	GenBank Accession #	chip上の DNA量 ($\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	ターゲット断片 region [nt] (長さ [bp])	決定に要したノー ザンハイブリダイ ゼーションの実 施数
核酸代謝関連酵素					
thymidylate synthase	TS	NM_001071	1	1099-1466 (368)	1
dihydropyrimidine dehydrogenase	DPD	U09178	10	1150-1537 (388)	4
orotate phosphoribosyltransferase (uridine monophosphate synthetase)	OPRT (UMPS)	NM_000373	2	1299-1662 (364)	1
thymidine phosphorylase	TP	M63193	10	490-797 (308)	4
thymidine kinase 1	TK1	NM_003258	2.5	595-908 (314)	2
ribonucleoside-diphosphate reductase M1 subunit	RRM1	X59543	5	1669-2010 (342)	3
ribonucleoside-diphosphate reductase M2 subunit	RRM2	NM_001034	1	1840-2097 (258)	3
uridine cytidine kinase 2	UCK2	AF236637	2.5	61-609 (549)	3
uridine phosphorylase	UP	NM_003364	10	931-1314 (384)	3
cytidine deaminase	CDA	L27943	5	304-605 (302)	3
5' nucleotidase	NT5	NM_002526	5	2800-3073 (274)	3
IMP dehydrogenase 1	IMPD	NM_000883	5	1967-2220 (254)	4
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	MTHFD1	NM_005956	2.5	1768-2071 (304)	3
RNA polymerase 2	RP2	NM_000937	2.5	1457-1787 (331)	6
uridine monophosphate kinase	UMPK	NM_016308	5	719-1003 (285)	4
CTP synthase	CTPS	NM_001905	2.5	2130-2394 (265)	3
deoxycytidylate deaminase	DCD	NM_001921	5	1176-1543 (368)	3
deoxycytidine kinase	DCK	NM_000788	5	542-963 (422)	2
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	PRPS	D00860	5	1152-1473 (322)	3
hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	NM_000194	2.5	824-1214 (391)	2
folylpolyglutamate synthetase	FPGS	NM_004957	10	92-311 (220)	3
nucleoside diphosphate kinase A	NDKA	X17620	0.5	299-662 (364)	1
nucleoside diphosphate kinase B	NDKB	L16785	0.5	210-581 (372)	1
adenine phosphoribosyltransferase	APRT	NM_000485	5	154-559 (406)	1
adenosine kinase	AK	U33936	5	651-1019 (369)	1

表 3

遺伝子名	略称	GenBank Accession #	chip上の DNA量 (pmol/ μ L)	ターゲット断片 region [nt] (長さ [bp])	決定に要したノー ザンハイブリダイ ゼーションの実施 数
遺伝子修復関連酵素					
DNA excision repair protein ERCC1	ERCC1	NM_001983	5	210-526 (317)	2
uracil-DNA glycosylase	UDG	X15653	2.5	1553-1943 (391)	1
poly(ADP-ribose) polymerase	PARP	NM_001618	2.5	2684-3093 (410)	3
DNA ligase I	LIG1	NM_000234	5	1363-1671 (309)	3
DNA ligase III	LIG3	X84740	10	1680-2034 (355)	2
DNA ligase IV	LIG4	NM_002312	10	2088-2498 (411)	4
DNA polymerase β	POLB	NM_002690	5	110-444 (335)	2
DNA polymerase δ	POLD	NM_002691	5	1198-1459 (262)	3
DNA repair protein XRCC1	XRCC1	NM_006297	10	898-1265 (368)	3
薬剤耐性関連因子					
topoisomerase 1	TOP1	J03250	2.5	1133-1456 (324)	3
P-glycoprotein	MDR1	NM_000927	5	1617-1881 (265)	3
equilibrative nucleoside transporter 1	ENT1	NM_004955	2.5	148-403 (256)	3
multidrug resistance-associated protein 1	MRP1	L05628	10	3841-4239 (399)	5
topoisomerase 2 α	TOP2A	NM_001067	2.5	3037-3389 (353)	6
topoisomerase 2 β	TOP2B	X68060	2.5	3142-3515 (374)	3
heat shock protein 27	Hsp27	NM_001540	1	323-534 (212)	3
equilibrative nucleoside transporter 2	ENT2	AF034102	5	1941-2263 (323)	3
その他					
E2F1	E2F1	M96577	5	1014-1309 (296)	5
p53	p53	NM_000546	2.5	796-1130 (335)	2
VEGF β	VEGFB	U48801	10	97-375 (279)	1
integrin $\alpha 3$	ITGA3	NM_002204	2.5	2563-2930 (368)	3
Mn SOD	SOD2	NM_000636	2.5	60-329 (270)	1
Cu/Zn SOD	SOD1	X02317	2.5	53-312 (260)	2
proliferating cell nuclear antigen	PCNA	NM_002592	1	108-423 (316)	1
ハウスキーピング遺伝子 (内部標準として使用)					
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	X01677	0.5	453-785 (333)	2
β -actin	ACTB	NM_001101	0.5	820-1083 (264)	2
40S ribosomal protein S9	RSP9	U14971	0.5	325-685 (361)	1

C. スポットティングと後処理

あらかじめポリリジンコートしてあるスライドガラスに、スポットター (OmniGrid, GENEMACHINES) を用いて 95℃ で 3 分熱変性したターゲット断片をスポットティングした。その後、紫外線にてターゲット断片をスライドガラスにクロスリンクし、ブロッキング溶液 (8 重量% Block A in PBS) の入ったラックに入れて 30 分振盪したのち TE バッファーで洗浄して乾燥させた。スライドガラスは使用するまでデシケーターに入れて遮光下で保存した。このようにして本発明 DNA アレイを得た。

D. 蛍光 DNA プローブの調製

腫瘍細胞から調整した全 RNA (上記 (2) と同一の方法による) を鋳型に、個々の遺伝子の mRNA に特異的なプライマーを用いて、逆転写酵素反応を利用して蛍光標識した。標識反応に必要な試薬は以下の通りである。

- ・ 逆転写酵素 Superscript II (Gibco BRL)
- ・ (反応バッファー、DTT)
- ・ プライマー混合液 (52 種の遺伝子に特異的なリバープライマーを混合したもの。リバープライマーは参考例 1 にて用いた特異的プライマーのうちの片方)
- ・ dATP, dGTP, dCTP, dTTP (アマシャムファルマシア)
- ・ Cy3-dUTP (アマシャムファルマシア)
- ・ Cy5-dUTP (アマシャムファルマシア)
- ・ 0.5M EDTA
- ・ 1N NaOH
- ・ 1M Tris-HCl (pH7.5)
- ・ TE バッファー

全 RNA (30 μ g)、プライマー混合液 (50 pmol each) と蒸留水を混合し、9 μ L に調整したものを 65℃ で 2 分間熱変性して氷上で急冷した。反応バ

ッファー (1×)、DTT (10mM)、dTTP (0.2mM)、dATP (0.5mM)、dGTP (0.5mM)、dCTP (0.5mM)、Cy3-dUTP又はCy5-dUTP (0.1mM)、Superscript II (10U/μL)を添加し、蒸留水にて全量を20μLとした(括弧内は終濃度を示す)。42℃で60分反応させた後蒸留水20μL、0.5M EDTA 5μL、1N NaOH 5μLを添加して65℃で60分インキュベートすることによりRNAを分解し、25μLの1M Tris-HClを加えて中和した。200-400μLのTEバッファーを加え、反応液を限外濾過法(Microcon-30、ミリポア)により脱塩・濃縮し(この工程で、プローブに取り込まれなかったCy3-dUTP又はCy5-dUTPや、リバースプライマーも除去される)、最終的に約10μLのプローブ溶液を得た。

E. ハイブリダイゼーション

上記蛍光DNAプローブ溶液に20×SSCを3μLと蒸留水を加え、20μLとし(終濃度3×SSC)、95℃で3分間熱変性させ、室温で放置して冷却させた。そこに10重量%SDSを2μLと蒸留水を加えて40μLとし(終濃度0.5重量%)、A~Cの工程で作製したDNAアレイに滴下して、カバーガラスを上からかぶせて覆った(気泡が入らないように静かに乗せた)。DNAアレイをハイブリダイゼーションチャンバーにセットし、65℃で10~20時間インキュベートした後、0.2重量%SDSを含む2×SSC溶液中加入してカバーガラスを静かに外し、そのまま5分間洗浄した。更に、0.2重量%SDSを含む2×SSC溶液中で1回、0.2重量%SDSを含む0.2×SSC溶液中で2回の洗浄の工程を繰り返し、最後に0.2×SSCで2回リンスした(洗浄の工程はすべて室温で行った)。DNAアレイをラックに入れ、600rpmで20秒間遠心して水分を飛ばし、室温で乾燥させてから、DNAマイクロアレイ用蛍光スキャナー(GenePix, Axon)で蛍光シグナルを測定した。

試験1: DNA断片の特異性

ノーザンハイブリダイゼーションにおいて、プローブ合成の鋳型として用いたDNA断片の特異性は、同一遺伝子であっても設計されたリージョンによって様々だった。実例として、XRCC1とE2F1を図2に示す。XRCC1では898-1265ntのリージョンは良好（目的とする遺伝子のmRNAと同じ長さのサイズに強いシグナルが見られた）だったが、187-494ntはクロスハイブリダイゼーションが多く不適と判断された。同様に、E2F1では1014-1309ntのリージョンは良好だったが、788-1087ntは不適であった。他の遺伝子についても程度の差はあるものの特異性は多様だった。最終的に、対象遺伝子において最も特異性の良好だったDNA断片を選択してターゲット断片とした。

試験2：ノーザンハイブリダイゼーションの定量性

DNAアレイの定量性は、ノーザンハイブリダイゼーションと比較することにより確認できる。そこで、本発明者らが採用したノーザンハイブリダイゼーションの測定系（実施例1（2））の定量性を改めて確認するために、RNA量と測定値（シグナル強度）との相関関係を調べた。

前記の14種のヒト腫瘍細胞由来の全RNAを変性アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブレンにブロットし、GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) のターゲットDNAから合成したプローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションを実施した（方法の詳細は実施例1（2）と同じ）。結果を画像解析用ソフト(ImageQuant、Molecular Dynamics Inc)で解析し、GAPDH mRNAと対応するシグナル強度を定量した。

泳動した全RNA量とノーザンハイブリダイゼーションの測定値との関係を図3に示す。全RNA量とシグナル強度の間の直線関係は明らかであり（ $r = 0.95$ 、 $p < 0.01$ ）、定量性が高いことが示された。

試験3：ユニバーサルプライマーのバックグラウンドに及ぼす影響

図1に示すように、ユニバーサルプライマー(forward (PCR-F) /reverse

(pCR-R)をベクターのマルチクローニングサイトの配列を元に設計した。ユニバーサルプライマーを用いることで、52種すべてのターゲット断片を一定の効率で増幅できるようになったため、特異的プライマーと比較してターゲット断片の安定供給が容易になった。

ターゲット断片をスポッティングするときに混入してくるプライマーのバックグラウンドに及ぼす影響を調べるために、ユニバーサルプライマー（5スポット）と特異的プライマー（表2及び表3に記載の5種のターゲットDNA断片〔TS, DPD, OPRT, LIG4, GAPDH〕の両端約20bpの配列に対応するプライマーをそれぞれ1スポットずつ）を等量ずつスライドガラスにスポットし、実施例1（3）で示した手順によりハイブリダイゼーションを行い、それぞれのシグナル強度を測定した。

ユニバーサルプライマー（5スポット）のシグナル強度の平均値は27.3、標準偏差（SD）は6.5、変動係数（CV）は24.0%であったのに対し、特異的プライマー（5スポット）のシグナル強度の平均値は22.9、標準偏差（SD）は12.0、変動係数（CV）は52.4%であった。シグナル強度はほぼ同等であったものの、ユニバーサルプライマーの方がSD、CVともに小さいことより、ユニバーサルプライマーの方がスポット間におけるバックグラウンドのばらつきに及ぼす影響が比較的小さいことが示された。

更に、バックグラウンドを極力抑えるために、ターゲット断片を増幅するときに用いるユニバーサルプライマーの必要最少量を検討した。forward/reverseプライマーをそれぞれ10, 20, 30, 40, 50 pmol用いてPCRにかけ、産物をアガロースゲル泳動したところ、20 pmol以下では産物量が減少することが確認できたので、ユニバーサルプライマーの必要最少量を30 pmolと決定した。

実施例2 ヒト腫瘍細胞中の種々の遺伝子発現量の測定

（1）ノーザンハイブリダイゼーション法による測定

DNAアレイに乗せるターゲット断片を決定する過程で、前記の14種のヒト

腫瘍細胞における52種の遺伝子のノーザンハイブリダイゼーションの結果を元に（実施例1（2）参照）、それぞれの遺伝子の発現量を画像解析した。なお、発現量は、3種のハウスキーピング遺伝子（GAPDH, ACTB, RSP9）の発現量の平均値に対する相対値として表わした。

（2）DNAアレイによる測定

52種の遺伝子ターゲット断片を乗せたDNAアレイを作製し、ノーザンハイブリダイゼーションで用いた14種の細胞から抽出した全RNAを元に調製した蛍光DNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを実施し、それぞれの遺伝子の発現量を測定した（方法の詳細は実施例1（3）と同じ）。なお、発現量は、3種のハウスキーピング遺伝子（GAPDH, ACTB, RSP9）の発現量の平均値に対する相対値として表わした。

（3）ノーザンハイブリダイゼーション法とDNAアレイの相関

前記の14種のヒト腫瘍細胞における52種の遺伝子の発現量について、ノーザンハイブリダイゼーション法とDNAアレイで測定した結果の相関を調べるために回帰分析した（表4）。相関の程度（相関係数）は、遺伝子の種類によってまちまちであったが、20種の遺伝子については5%未満の危険率において有意な相関が認められた。9種の遺伝子については、有意ではなかったものの、相関する傾向が認められた（ $p < 0.1$ ）。3種のハウスキーピング遺伝子を含む12種の遺伝子（MTHFD1, SOD1, AK, E2F1, POLD, LIG3, RSP9, HPRT1, ACTB, UDG, GAPDH, LIG1）については、発現量のばらつきが細胞間で小さいため正規分布をしているとはいえず、相関性は低い又は評価不能であった。

表 4

略称	R (相関係数)	P-value	相関性	有意性 (P<0.05)
ERCC1	0.90	9.4E-06	高い	あり
p53	0.90	1.1E-05	高い	あり
MDR1	0.90	1.3E-05	高い	あり
DPD	0.89	2.2E-05	高い	あり
CDA	0.87	5.0E-05	高い	あり
TS	0.85	1.1E-04	高い	あり
PRPS	0.85	1.2E-04	高い	あり
NDKB	0.80	6.5E-04	比較的高い	あり
POLB	0.79	7.3E-04	比較的高い	あり
XRCC1	0.77	1.3E-03	比較的高い	あり
MRP1	0.76	1.4E-03	比較的高い	あり
ENT2	0.75	2.0E-03	比較的高い	あり
APRT	0.75	2.2E-03	比較的高い	あり
Hsp27	0.67	8.2E-03	比較的高い	あり
VEGFB	0.60	2.2E-02	比較的高い	あり
TOP2B	0.57	3.3E-02	中程度	あり
LIG4	0.57	3.4E-02	中程度	あり
ENT1	0.55	4.3E-02	中程度	あり
RRM2	0.54	4.6E-02	中程度	あり
IMPD	0.54	4.8E-02	中程度	あり
NDKA	0.53	5.3E-02	中程度	なし
RP2	0.51	6.2E-02	中程度	なし
TP	0.50	7.1E-02	中程度	なし
RRM1	0.49	7.7E-02	中程度	なし
UCK2	0.45	1.1E-01	中程度	なし
FPGS	0.44	1.2E-01	中程度	なし
CTPS	0.44	1.2E-01	中程度	なし
UMPS (OPRT)	0.42	1.3E-01	中程度	なし
SOD2	0.42	1.4E-01	中程度	なし
UP	0.39	1.6E-01	比較的低い	なし
NT5	0.34	2.3E-01	比較的低い	なし
TK1	0.34	2.4E-01	比較的低い	なし
DCK	0.33	2.5E-01	比較的低い	なし
TOP2A	0.32	2.7E-01	比較的低い	なし
DCD	0.27	3.5E-01	比較的低い	なし
ITGA3	0.26	3.7E-01	比較的低い	なし
PARP	0.24	4.1E-01	比較的低い	なし
TOP1	0.23	4.3E-01	比較的低い	なし
PCNA	0.23	4.3E-01	比較的低い	なし
UMPCK	0.21	4.6E-01	比較的低い	なし
LIG1	0.06	8.3E-01	低い	なし
MTHFD1	0.40	1.6E-01	評価不能	なし
SOD1	0.39	1.6E-01	評価不能	なし
AK	0.37	1.9E-01	評価不能	なし
E2F1	0.29	3.2E-01	評価不能	なし
POLD	0.28	3.3E-01	評価不能	なし
LIG3	0.27	3.4E-01	評価不能	なし
RSP9	0.26	3.7E-01	評価不能	なし
HPRT1	0.25	3.8E-01	評価不能	なし
ACTB	0.20	5.0E-01	評価不能	なし
UDG	0.17	5.7E-01	評価不能	なし
GAPDH	0.14	6.4E-01	評価不能	なし

(4) DNAアレイの判定力

実際に医療現場で使用されることを想定した場合、診断（薬剤の適正使用）を使用目的とするこのようなツールは、通常ある閾値を境にして陽性又は陰性であると評価される。例えば、RT-PCR法で測定したTSやDPDのmRNAレベルを5-FUの適正使用の指標と見なした研究でも、レベルの高低を判断するための閾値が設定されている(Clinical Cancer Research, 6, 1322-1327, 2000)。本発明のDNAアレイの診断判定力をノーザンハイブリダイゼーションと比較することにより以下の方法で評価した。

前記の14種のヒト腫瘍細胞を臨床検体に相当するものと見なし、すべての細胞について52種の遺伝子発現量を本発明のDNAアレイ及びノーザンハイブリダイゼーションにより測定した（それぞれの測定法において、測定ポイントは52種遺伝子×14種細胞＝728ポイント算出された）。本発明のDNAアレイの測定値をもとに、各遺伝子について14種の細胞が示す発現量の中央値を求めた。中央値を基準とみなしたときの14種の細胞における相対的発現量（中央値に対する発現量の比）を算出した。閾値を2倍と設定し、相対的発現量が閾値を越える（2以上または0.5以下）較差が見られた細胞を「陽性」、閾値を越えないものを「陰性」と判定した。またノーザンハイブリダイゼーションによる判定結果を信頼性の高いものとみなし、本発明のDNAアレイによる判定結果が一致すれば「真」、一致しなければ「偽」と評価した。図4に示すように、陽性・陰性の判定結果が「真」であったのは82.3%と高率であった。また、陽性と判定された75ポイントのうち、77.3%（58/75）がノーザンハイブリダイゼーションの結果と一致した。また、相反する結果（例えば、両方とも真陽性だがノーザンハイブリダイゼーションによる相対的発現量が0.3で本発明のDNAアレイによる相対的発現量が2.5のようにまったく食い違っているという意味）は1例もなかった。このように、本発明のDNAアレイは、ノーザンハイブリダイゼーションとほぼ同程度の診断判定力があることが示された。

（5）DNAアレイの検出力

試験4の4)において、判定の対象となった728ポイント(52種遺伝子×14種細胞)のうち、測定不可能であった62ポイントについてはノーザンハイブリダイゼーションでも検出されなかった。このことより、本発明のDNAアレイはノーザンハイブリダイゼーションと同等以上の検出力を有していることが示された。

実施例3 可移植性ヒト腫瘍株中の種々の遺伝子発現量とTS-1に対する感受性との相関

(1) TS-1に対する感受性試験

本発明のDNAアレイを臨床応用する際、例えば癌組織中に発現している52種の遺伝子発現量と5-FU系抗癌剤の抗腫瘍効果との間の相関を解析することにより、感受性規定因子として実際にどの遺伝子が重要であるのかを見極めるために用いることが想定される。

本試験では、抗腫瘍効果を検討する実験モデルとして、11種の可移植性ヒト腫瘍株(xenograft。由来は、胃癌4株、大腸癌3株、肺癌2株、乳癌2株)のTS-1に対する感受性試験を実施した(TS-1は大鵬薬品工業(株)が開発した5-FU系抗癌剤の1種であり、5-FUのプロドラッグであるテガフル、DPD阻害剤であるギメラシル及び orotate phosphoribosyl transferase の阻害剤であるオテラシルカリウムをモル比にして1:0.4:1にて含有している配合剤である)。各種 xenograft をヌードマウスの背部皮下に移植し、100-200mm³の大きさに達したときに対照群(薬剤非投与群)とTS-1投与群に群分けし(1群あたり6匹)、翌日から1日1回、14日間連日TS-1を10mg/kg/day(FT量として)の用量で経口投与し、投薬終了翌日に腫瘍体積を測定して対照群の腫瘍体積と比較し、腫瘍増殖抑制率(inhibition rate, IR)を求めた。IRは以下の式により算出した。

$$IR(\%) = (1 - [TS-1 \text{ 投薬群の相対腫瘍体積}] / [\text{対照群の相対腫瘍体積}]) \times 100$$

$$(\text{相対腫瘍体積}) = (\text{判定時の腫瘍体積}) / (\text{群分け時の腫瘍体積})$$

(2) 本発明のDNAアレイによる測定

上記の11種の xenograft から抽出した全RNAを材料とし、52種の遺伝子の発現量を測定した。試験方法は、実施例2に準じて行った。なお、発現量は、3種のハウスキーピング遺伝子 (GAPDH, ACTB, RSP9) の発現量の平均値に対する相対値として表わした。

(3) 11種の xenograft 中の遺伝子発現量とTS-1に対する感受性との相関

上記(1)および(2)の検討により得られた11種の xenograft 中の52種の遺伝子発現量とTS-1に対する感受性 (IR, %) との関連を調べるために、総当り (52通り) で回帰分析を実施した。その結果、相関係数 (P値: Pearson の積率相関係数) の絶対値が0.5を上回った遺伝子が4種 (UDG, PCNA, TS, TK1) あった (図5)。P値は0.05以上0.1未満であり、統計上有意ではなかったものの、N数が11と少なかったこともあり、相関の傾向は回帰直線から見ても十分に判定できた。これら4種の遺伝子にTSが含まれていたことは注目に値する。TSは、5-FU系抗癌剤の感受性規定因子の代表的なものであり、TS発現量が高いと5-FU系抗癌剤は奏効しにくいとの知見が基礎・臨床の双方から得られている。本検討でも、TS発現量とTS-1の抗腫瘍効果の間には負の相関 ($r = -0.53$) があった点でこれまでの知見と一致している。さらに、確認試験として測定精度が極めて高いとされているリアルタイムRT-PCR法により11種の xenograft 中のTS発現量 (GAPDHに対する相対発現量) を測定し、TS-1に対する感受性との相関を解析したところ、相関係数は-0.65で有意な ($P = 0.030$) 相関が認められた (図6)。この結果より、本発明のDNAアレイは5-FU系抗癌剤の感受性規定因子の候補を52種の遺伝子から絞り込む上で有用であることが示された。さ

らにN数を増やせば、臨床検体を用いて5-FU系抗癌剤の感受性規定因子を絞り込むことも可能であろうし、絞り込まれた遺伝子の発現量を解析することで、5-FU系抗癌剤の適正使用の指標とすることができる。

産業上の利用可能性

本発明によれば、検体中の数十～数百種の遺伝子発現を、一度だけの簡便なアッセイで定量性よく測定できる。本発明の測定法を用いて被検体（例えば癌患者の末梢血単核球や腫瘍組織から抽出した全RNA）中の、代謝拮抗剤系抗癌剤又はこれと他の抗癌剤の併用の作用機序に関連している遺伝子発現様式を解析することで、これらの抗癌剤の適正使用の指標とすることができる。

請求の範囲

1. 核酸代謝関連酵素遺伝子群、遺伝子修復関連酵素遺伝子群、薬剤耐性関連因子遺伝子群及びハウスキーピング遺伝子群の各群からの少なくとも2種以上を含む少なくとも13種以上の標的遺伝子の断片であって、

次のステップ1)及び2)、

1) データベースを利用したホモロジー検索により、標的遺伝子に特異性の高い断片を選択するステップ、

2) 1)のステップで選択された断片をプローブとして腫瘍細胞から得られたRNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行い、標的遺伝子に対する特異性を確認するステップ、

を行うことにより選択された断片を、基板上に固定化してなることを特徴とする代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性の測定用DNAアレイ。

2. 基板上への各断片の固定量が、腫瘍細胞における標的遺伝子の発現量に応じて調節されている請求項1記載のDNAアレイ。

3. ステップ2)で選択された断片を、配列番号1及び2で示される塩基配列を有するユニバーサルプライマーを用いるPCRにより取得するものである請求項1又は2記載のDNAアレイ。

4. 核酸代謝関連酵素遺伝子群が、少なくともチミジル酸シンターゼ遺伝子、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ遺伝子、オロテートホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子、チミジンホスホリラーゼ遺伝子及びチミジンキナーゼ1遺伝子を含む遺伝子群であり；

遺伝子修復関連酵素遺伝子群が、少なくともDNA切除修復蛋白ERCC1遺伝子及びウラシル-DNAグリコシラーゼ遺伝子を含む遺伝子群であり；

薬剤耐性関連遺伝子群が、少なくともトポイソメラーゼ1遺伝子、P-グリコ

プロテイン遺伝子、平衡ヌクレオシドトランスポーター 1 遺伝子及び多剤耐性関連蛋白 1 遺伝子を含む遺伝子群であり；

ハウスキーピング遺伝子群が、グリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子、 β -アクチン遺伝子及び 40S リボソーム蛋白 S 9 遺伝子から選ばれる 2 種以上の遺伝子群である請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の DNA アレイ。

5. 各標的遺伝子断片が、200～600bpである請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の DNA アレイ。

6. 少なくとも次の (A)、(B)、(C) 及び (D) の断片を、基板上に固定化してなることを特徴とする代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性の測定用 DNA アレイ。

(A) 配列番号 3 で示される塩基配列を有するチミジル酸シンターゼ遺伝子断片、配列番号 4 で示される塩基配列を有するジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ遺伝子断片、配列番号 5 で示される塩基配列を有するオロテートホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子断片、配列番号 6 で示される塩基配列を有するチミジンホスホリラーゼ遺伝子断片及び配列番号 7 で示される塩基配列を有するチミジンキナーゼ 1 遺伝子断片を含む核酸代謝関連酵素遺伝子群の断片；

(B) 配列番号 28 で示される塩基配列を有する DNA 切除修復蛋白 ERCC 1 遺伝子断片及び配列番号 29 で示される塩基配列を有するウラシル-DNA グリコシラーゼ遺伝子断片を含む遺伝子修復関連遺伝子群の断片；

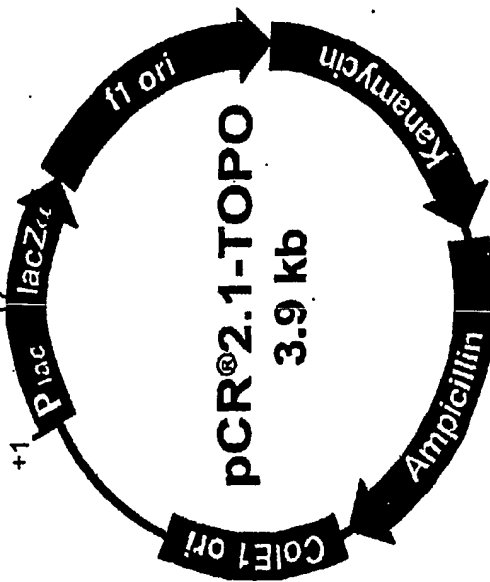
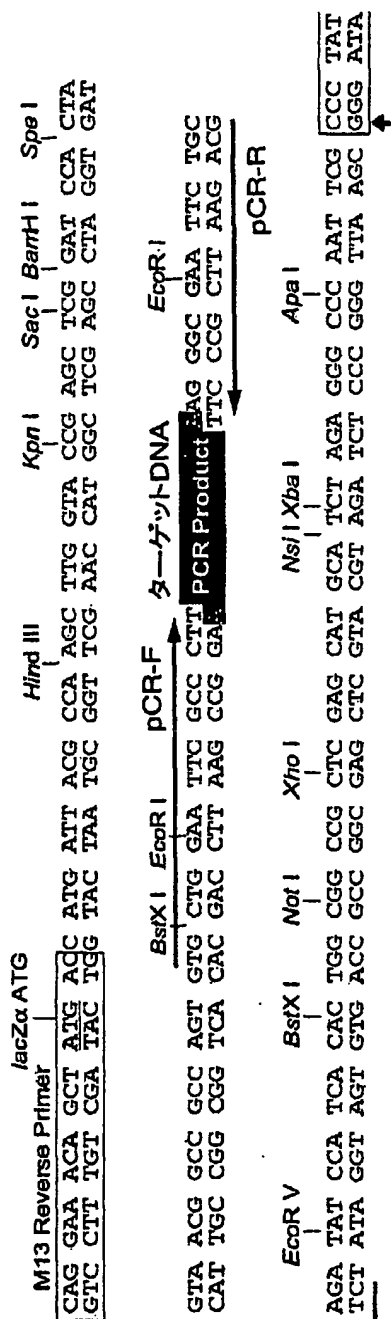
(C) 配列番号 37 で示される塩基配列を有するトポイソメラーゼ 1 遺伝子断片、配列番号 38 で示される塩基配列を有する P-グリコプロテイン遺伝子断片、配列番号 39 で示される塩基配列を有する平衡ヌクレオシドトランスポーター 1 遺伝子断片及び配列番号 40 で示される塩基配列を有する多剤耐性関連蛋白 1 遺伝子断片を含む薬剤耐性関連遺伝子群の断片；

(D) 配列番号 52 で示される塩基配列を有するグリセロアルデヒド-3-ホ

スフェートデヒドロゲナーゼ遺伝子断片、配列番号 53 で示される塩基配列を有する β -アクチン遺伝子断片及び配列番号 54 で示される塩基配列を有する 40S リボソーム蛋白 S9 遺伝子断片から選ばれる 2 種以上のハウスキーピング遺伝子群の断片。

7. 請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の DNA アレイに、癌患者由来の体液検体又は組織検体から得られた mRNA を鋳型として合成した標識 cDNA プローブをハイブリダイズさせることを特徴とする当該体液検体又は組織検体の代謝拮抗剤系抗癌剤又は当該抗癌剤と他の抗癌剤との併用に対する感受性の測定方法。

1



The sequence above represents the pCR®2.1-TOPO vector with a PCR product inserted by TA Cloning®.

The arrow (↓) indicates the start of transcription for the T7 RNA polymerase.

A-170403

図 2

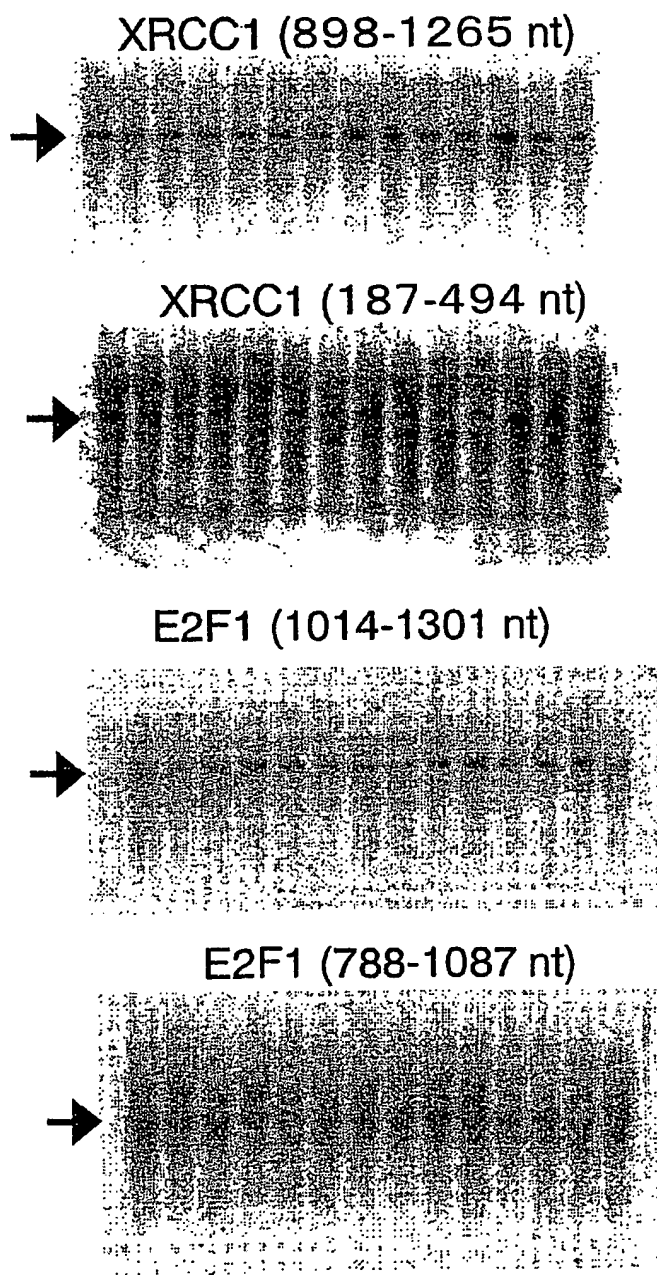


図 3

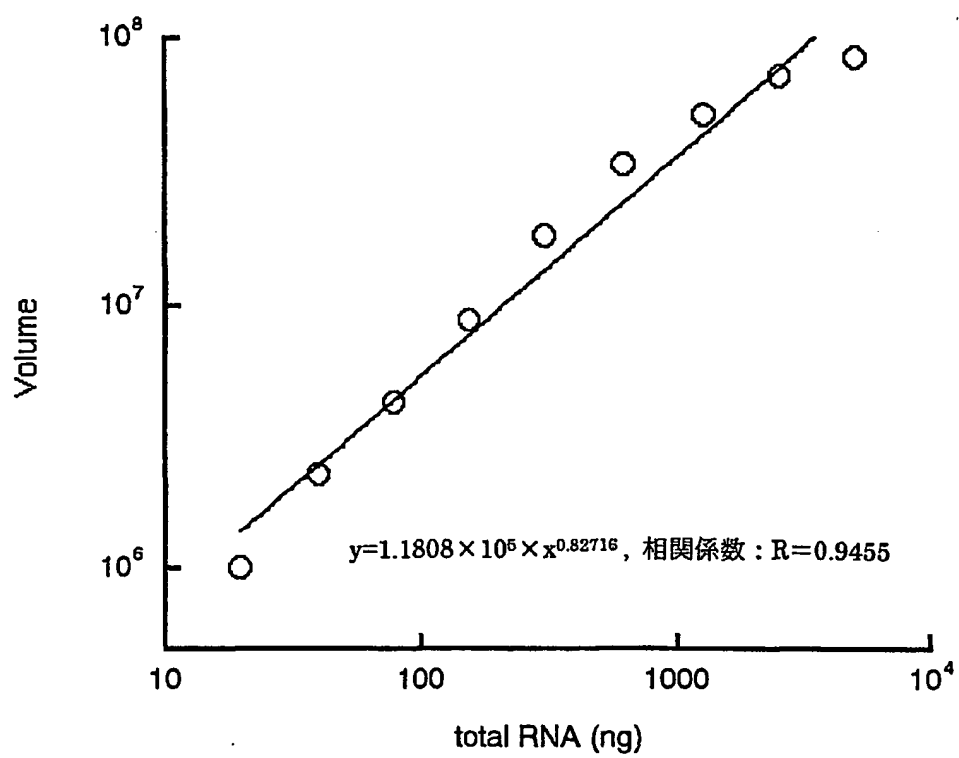


図4

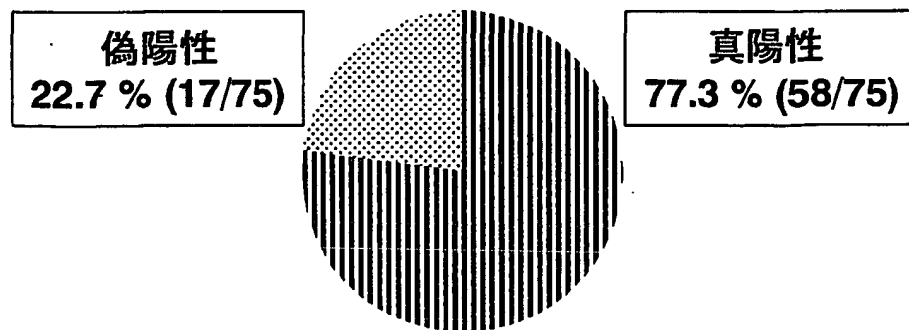
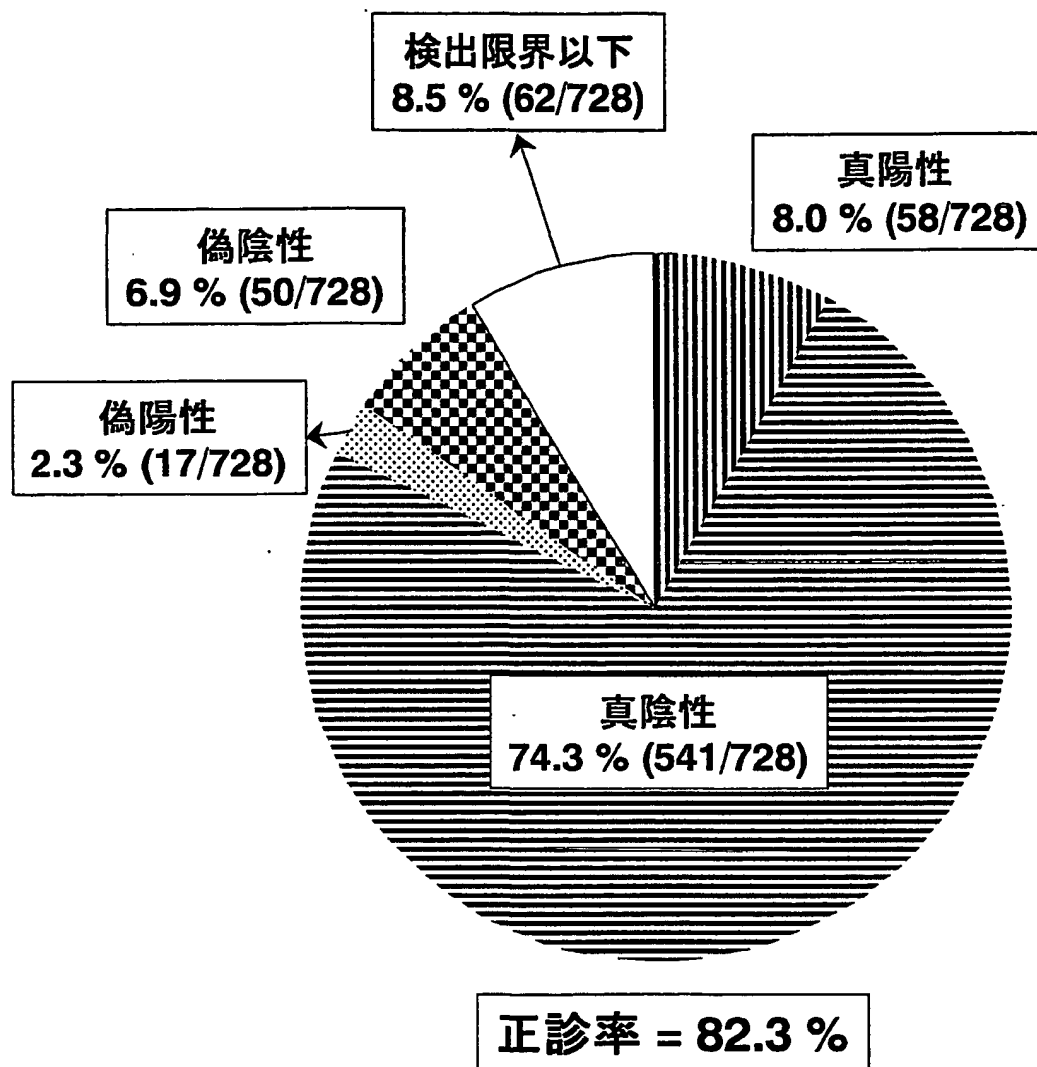


図5

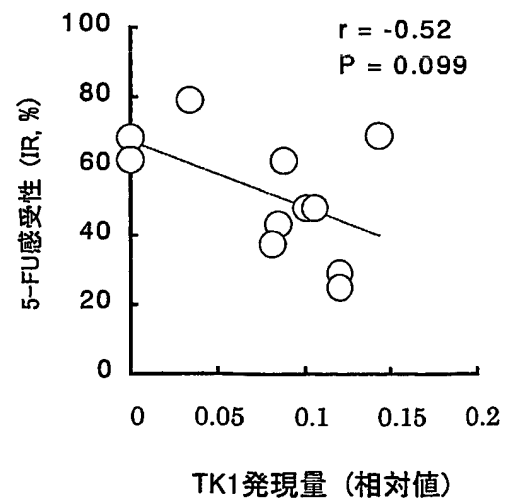
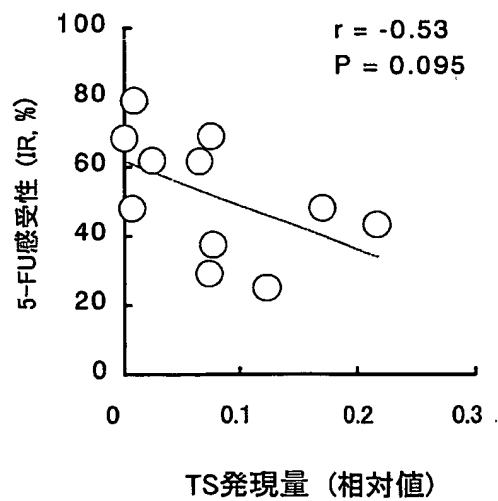
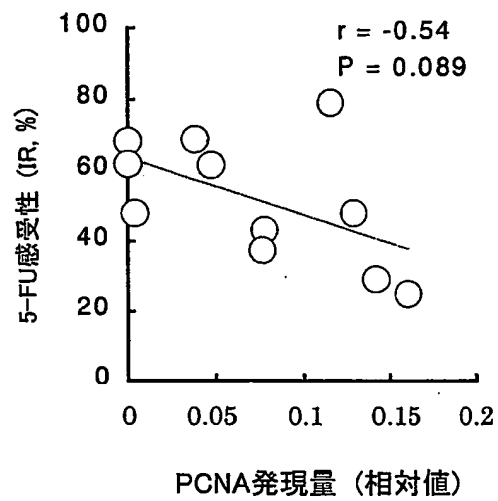
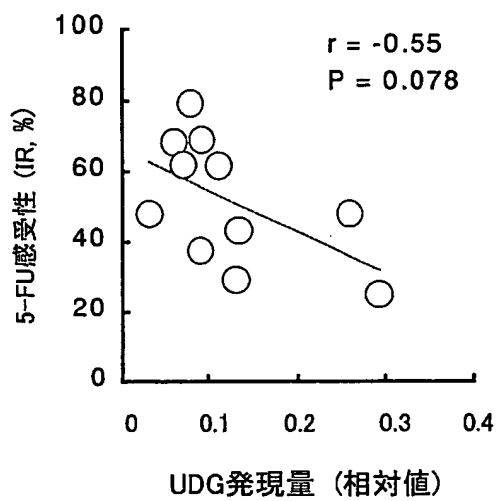
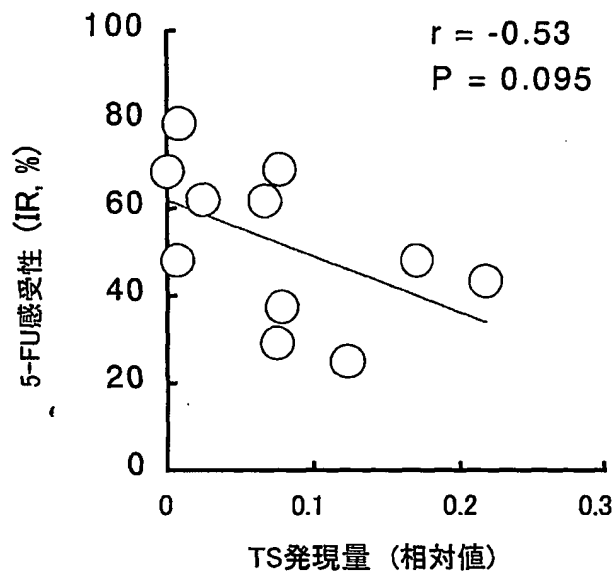
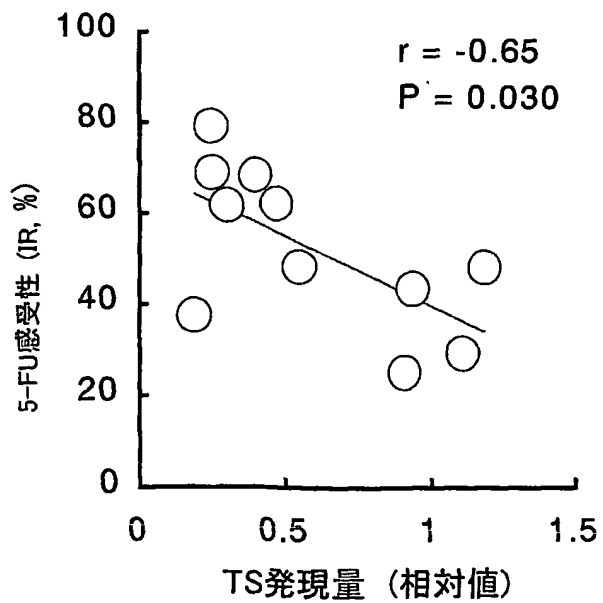


図6

本発明DNAアレイによるTS発現量測定



リアルタイムRT-PCR法によるTS発現量測定



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> TAIHO PHARMACEUTICAL CO. , LTD

<120> DNA array

<130> TH0030

<140>

<141>

<150> JP P2001-204448

<151> 2001-07-05

<150> JP P2001-239181

<151> 2001-08-07

<160> 54

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
universal primer (pCR-R)

<400> 1

tgctggaatt cgccct

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
universal primer (pCR-R)

<400> 2

ctgcagaatt cgccct

16

<210> 3

<211> 368

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on TS

<400> 3

```
ggatgccgag gtaaaagtic tttttgctct aaaagaaaaa ggaactaggt caaaaatctg 60
tccgtgacct atcagttatt aatttttaag gatgttgcca ctggcaaattg taactgtgcc 120
agtictttcc ataataaaag gctttgagtt aactcactga gggtatctga caatgctgag 180
gttatgaaca aagtgaggag aatgaaatgt atgtgctctt agcaaaaaca tgtatgtgca 240
tttcaatccc acgtacttat aaagaaggtt ggtgaatttc acaagctatt ttggaatat 300
ttttagaata ttttaagaat ttcacaaagt attccctcaa atctgaggga gctgagtaac 360
accatcga                                     368
```

<210> 4

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on DPD

<400> 4

```
cgccgagtgt tcatcgtctt cagaaaaggc ttgtitaata taagagctgt ccctgaggag 60
```

atggagcttg ctaaggaaga aaagtgtgaa ttcttgccat tcctgtcccc acggaagggt 120
 atagtaaaag ggggagaat igtigtatg cagtttgttc ggacagagca agatgaaact 180
 ggaaaatgga atgaagatga agatcagatg giccatctga aagccgatgt ggicacagt 240
 gcctttgggt cagtictgag tgaicctaaa gtaaaagaag ccttgagccc tataaaattt 300
 aacagatggg gtctcccaga agtagatcca gaaactatgc aaactagtga agcatgggia 360
 ttgcagggtg gtgatgtcgt tggtttgg 388

<210> 5

<211> 364

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on OPRT

<400> 5

ggttttatit ctggctcccg aglaagcatg aaaccagaat ttcttcactt gactccagga 60
 gticagttag aagcaggagg agataatctt ggccaacagt acaatagccc acaagaagtt 120
 attggcaaac gaggttccga tatcatcatt gtaggtcgtg gcataatctc agcagctgat 180
 cgcttggaag cagcagagat gtacagaaaa gcctgttggg aagcgtatit gagtagactt 240
 ggtgtttgag tgcctcagat acatttttca gatacaatgt gaagacattg aagatatgtg 300
 gtccctccga aagtcactgg ctggaaataa tccaattatt ccgtgttga ttcttccaca 360
 gggc 364

<210> 6

<211> 308

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on TP

<400> 6

gacaaggica gcctggtcct cgcacctgcc ctggcggcat gtggctgcaa ggtgccaatg 60
atcagcggac gtggtctggg gcacacagga ggcaccttgg ataagctgga gtctattcct 120
ggattcaatg tcatccagag cccagagcag atgcaagtgc tgctggacca ggcgggctgc 180
tgtatcgtgg gtcagagtga gcagctgggt cctgcggacg gaatccata tgcagccaga 240
gatgtgacag ccaccgtgga cagcctgcca ctcatcacag cctccattct cagtaagaaa 300
ctcgtgga 308

<210> 7

<211> 314

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on TK1

<400> 7

aagtaccact cctgtgtctg gctctgctac ttcaagaagg cctcaggcca gcctgccggg 60
ccggacaaca aagagaactg cccagtgccg ggaaagccag gggaagccgt ggctgccagg 120
aagctctttg cccacagca gattctgcaa tgcagccctg ccaactgagg gacctgcaag 180
ggccgcccgc tcccttctg ccactgccgc ctactggacg ctgccctgca tgcctgccag 240
ccactccagg aggaagtcgg gaggcgtgga gggtagccac acctggcct tctgggaact 300
ctcctttgtg tggc 314

<210> 8

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on RRM1

<400> 8

aaataaacgc catgccccca ttggaattgg ggtacaaggt ctggcagatg cttttatcct 60
gatgagatac ccttttgaga gtcgagaagc ccagttactg aataagcaga tctttgaaac 120
tatttattat ggtgctctgg aagccagctg tgaccttgcc aaggagcagg gcccatagca 180
aacctatgag ggctctccag tiagcaaagg aattcttcag tatgatatgt ggaatgttac 240
tcctacagac ctatgggact ggaaggttct caaggagaag attgcaaagt atggtataag 300

aaacagittta cttattgccc cgaigcctac agcittccact gc

342

<210> 9

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on RRM2

<400> 9

gggagccaat tcacaattca ctaagtgact aaagtaagtt aaacttggtg agactaagca 60
tgtaatitit aagtititait llaatgaatt aaaatatitg ttaaccaact ttaaagtcag 120
tccigtgtat acctagatat tagtcagttg gtgccagata gaagacaggt tgtgtitit 180
tccigtggct tigttagigt ccigggatic icigccccct ctgagtagag igtigtggga 240
taaaggaatc tctcaggg 258

<210> 10

<211> 549

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on UCK2

<400> 10

```
cccaacggcg gcgagccctt ccctataggg gtcagcgggg gaacagctag cggcaagtct 60
tccgtgtgig ctaagatcgt gcagctcctg gggcagaatg aggtggacta tcgccagaag 120
caggtgggca tccigagcca ggatagcttc tacctgttcc ttacctcgga gcagaaggcc 180
aaagccciga agggccagtt caactttgac cacccggaig cctttgacaa tgaactcatt 240
ctcaaaacac tcaaagaaat cactgaaggg aaaacagttc agatccccgt gtaatgacitt 300
gtctcccaat cccggaagga ggagacagtt actgtctatc ccgcagacgt ggtgtctctt 360
gaagggatcc tggccttcta ctcccaggag gtacgagacc tgttccagat gaagcttttt 420
gtggatacag atgcggacac ccggctctca cgcagagtat taaggacat cagcgagaga 480
ggcagggatc ttgagcagat ttatctcag tacattacgt tcgtcaagcc tgcctttgag 540
gaattctgc
```

549

<210> 11

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on UP

<400> 11

ttctgcagag ctgagcgagt tcaccacagt ggtggggaac accatgtgca ccttggactt 60
 ctaatgaagg caagggcgtc tggatggggc tctctgctcc tacacggaga aggacaagca 120
 ggcgtatctg gaggcagcct atgcagccgg cgtccgcaat atcgagatgg agtcctcggt 180
 gtittgccgc atgtgcagcg cctgcggcct ccaagcggcc gtggigtgtg tcaccttctt 240
 gaaccgcctg gaaggggacc agatcagcag ccttcgcaat gtgctcagcg agtaccagca 300
 gaggcgcgag cggctgggtg gctacttcat caagaagaaa ctgagcaagg cctgagcgct 360
 gccctgcacc tccgcagacc tgct 384

<210> 12

<211> 302

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
 fragment based on CDA

<400> 12

ggcatctgtg ctgaacggac cgctatccag aaggccgict cagaagggtt caaggatttc 60
 agggcaatig ctatcgccag tgacatgcaa gatgatttta tctctccatg tggggccctgc 120
 aggcaagtca tgagagagtt tggcaccaac tggcccgtgt acatgaccaa gccggatggt 180
 acgtatatig tcatgacggt ccaggagctg ctgcccttct cctttgggcc tgaggaccig 240
 cagaagactc agtgacagcc agagaatgcc cactgcctgt aacagccacc tggagaactt 300
 ca 302

<210> 13

<211> 274

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on NT5

<400> 13

```
ttctaaacct gcacttgtcc ctctccagca agaggctagc actgaattca ttctactcat 60
actacacacc cagitatgga atgtccagag ttctcgaaga aaataaatga ctttaggaag 120
aggtatacat tttttaagtc gcctgcctc caaatctgaa cagtcactgt aaatcattct 180
taagcccaga tatgagaact tctgctggaa agtgggaccc tctgagtggg tggtcagaaa 240
atacccatgc tgaatgaaatg acctatgccc aaag                               274
```

<210> 14

<211> 254

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on IMPD

<400> 14

```
tcgtgcccta cctcatagca ggcatccaac acggctgccca ggatacggg gcccgagcc 60
tgtctgtcct tcggccaatg atgtactcag gagagctcaa gttigagaag cggaccaatgt 120
cgccccagat tgagggiggt gtccatggcc tgcactctta cgaaaagcgg ctgtactgag 180
gacagcggtg gaggccgagg tggaggagg galgcacccc aggtccact tttgggcaca 240
ggctccctcc ataa 254
```

<210> 15

<211> 304

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on MTHFD1

<400> 15

```
tcctggctct caccattct ctagaagaca tgagagagag actgggcaaa atggigtgtg 60
catccagtaa gaaaggagag cccgtcagtg ccgaagatct gggggtgagt ggtgcactga 120
cagtgttat gaaggacgca atcaagccca atcicatgca gacactggag ggcactccag 180
tgtttgtcca tgctggcccg ttgccaaca tcgcacatgg caattcctcc atcatigcag 240
accagatcgc actcaagcct gttggcccag aagggtttgt agtgacggaa gcaggatttg 300
gagc 304
```

<210> 16

<211> 331

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on RP2

<400> 16

```
aagagtggac ttctcgccc gtactgcat ccccccgac cccaacctct ccattgacca 60
ggttggcgtg ccccgctcca ttgtgccaa catgaccttt ggggagattg tcacccctt 120
caacattgac agacttcaag aactagtgcg cagggggaac agtcagtacc caggcgccaa 180
gtacatcatc cgagacaatg gtgatgcat tgacttgcgt ttccaccca agcccagtga 240
ccttcacctg cagaccggt ataaggigga acggcacatg tgtgatgggg acattgttat 300
cttcaaccgg cagccaatic tgcacaaaat g                                     331
```

<210> 17

<211> 285

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on UMPK

<400> 17

tctaaacctg aaagcatcct tgaaatcatg cttgaatatt gctttgatag ctgctatcat 60
gacccctttt taaggcaatt ctaatcttcc ataactacat ctcaattagt ggctggaaag 120
tacaaggtaa aacaaagtaa atttttttat gtcttttttt tggcacagg agtagacagt 180
gaattcagg ttaacttcac cttagttaag gtgctacca aacgaagggt atcagctatt 240
tttttttaa ttcaaaaaga atatcccttt tatagtttgt gcctt 285

<210> 18

<211> 265

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on CTPS

<400> 18

ccatcggtca ccttgtttct caactaccic gcatcattgc agatcgtagc gcgttgccctg 60
tcgctttccc ttggatacct agaccgttat aaagtgtgcc acatggactt accgagcatg 120
gagagaggat tttagctagg attigaacac ttggtgctgg gaacctcagg gtattgcttg 180
ccactaagcc atgaaccag agacaaaatc tctatactgc cctgagttgg ggggaattct 240
cagtgccaac tgtggctggc cctca 265

<210> 19

<211> 368

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on DCD

<400> 19

```
cagggtggig gcacattatc cctctggggg gtggggacgc ctgttgtttt ggctcaattt 60
gggtttgttg gtcacatgga gctcttccat ttcttttagc tgaataatga gttgttccta 120
gaggagacag cctgtctctc cttgttgccc ccaaagccca tgccctgccg tgggtggcagc 180
tggggctgig gatgggaggg glccccaaca tggatgtgtt gcccctcctc cgcatgccaa 240
cgcagttcat gtacaaggcc cctctgcaac tggagagaaa attaattcct atcccgigag 300
tggattgtga gaaattccac ccacgtggag acagcttact gcagcacigt tgggtgttcgg 360
agctcttc
```

368

<210> 20

<211> 422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on DCK

<400> 20

gaatctgtgta tagtgacagg tatatattttg catctaattt gtaigaatct gaatgcatga 60
atgagacaga gtaggacaatt tatcaagact ggcatgactg gatgaataac caatttggcc 120
aaagcccttga attggaatgga atcattttatc ttcaagccac tccagagaca tgccttacata 180
gaatatattt acggggaaga aatgaagagc aaggcattcc tcttgaatat ttagagaagc 240
ttcattataa acatgaaagc tggctcctgc ataggacact gaaaaccaac ttcgattatc 300
ttcaagaggt gcctatctta acactggatg ttaatgaaga ctttaaagac aaatatgaaa 360
gtctgggttga aaaggtcaaa gagtttttga gtacttttg atcttgcctga agactacagg 420
ca 422

<210> 21

<211> 322

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on PRPS

<400> 21

attcagcaga agaccggct tgcctcagtg tagctttcta catccacat caggatatatt 60
agagcttatc cgaactgggg aaagacggat tgagattaac tgctgggacc tctacctgc 120

attatctcat tctggcttcc ttgataattc tggggccit gcagctttaa ctatagctca 180
 gcigctgcaa gatitcagac tttgaggat gttgigtgag ggigtitgac tgtactggg 240
 gaagctcaga ctactttgta tglgaatgct tcagggtttt cttgtttgag aacaactagc 300
 aacaaaggca acctatgtgt ga 322

<210> 22

<211> 391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
 fragment based on HPRT1

<400> 22

gccatctgct tagtagagct tttgcatgt atcttctaag aattttatct gttttgtact 60
 ttgaaatgt cagttgctgc attcctaaac tgtttatttg cactatgagc ctatagacta 120
 tcagttccct ttgggcggat tgtgttttaa ctgttaaag aaaaaattct cttaaaccac 180
 agcactattg agtgaaacat tgaactcata tctgtaagaa ataaagagaa gatataattag 240
 ttttttaatt ggtattttaa tttttatata tgcaggaaag aatagaagtg attgaatatt 300
 gtttaattata ccaccgtgtg ttgaaaagt aagaagcagt caattttcac atcaaagaca 360
 gcatctaaga agttttgttc tgtccigga t 391

<210> 23

<211> 220

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on FPGS

<400> 23

```
cgcatgtca atacctgca gaccaatgcc ggctacctgg agcaggigaa gcgccagcgg 60
ggtgaccctc agacacagtt ggaagccaatg gaactgtacc tggcacggag tgggctgcag 120
gtggaggact tggaccggct gaacatcacc cactgactg ggacgaaggg gaagggtccc 180
acctgtgcct tcacggaatg taccctccga agctatggcc 220
```

<210> 24

<211> 364

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on NDKA

<400> 24

```
cggtagttgc catggtctgg gaggggctga atgiggtgaa gacgggccga gtcattctcg 60
```

gggagaccaa ccctgcagac tccaagcctg ggaccatccg tggagacttc tgcatacaag 120
ttggcaggaa cattatacat ggcagtgatt ctgtggagag tgcagagaag gagatcggct 180
tgtggtttca ccctgaggaa ctggtagatt acacgagctg tgctcagaac tggatctatg 240
aatgacagga gggcagacca cattgctttt cacatccatt tccccctcct cccatgggca 300
gaggaccagg ctgtaggaaa tctagttatt tacaggaact tcatcataat ttggagggaa 360
gctc 364

<210> 25

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on NDKB

<400> 25

acctgaaaga ccgaccattc ticcctgggc tggatgaagta catgaactca gggccgggtg 60
tggccatggt ctgggagggg ctgaacgtgg tgaagacagg ccgagtgatg ctitggggaga 120
ccaatccagc agattcaaag ccaggcacca ttcttgggga ctcttgcatc caggttggca 180
ggaacatcat tcatggcagt gattcagtaa aaagtgcctg aaaagaaatc agcctatggt 240
ttaagcctga agaactggtt gactacaagt ctgttgctca tgactgggtc tatgaataag 300
aggitggacac aacagcagtc tccctcagca cggcgtgggtg tgtccctgga cacagctctt 360
cattccattg ac 372

<210> 26

<211> 406

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on APRT

<400> 26

```
acatctcgcc cgtcctgaag gaccccgccct ccttccgcgc cgccatcggc ctcttggcgc 60
gacacctgaa ggcgaccac gggggccgca tcgactacat cgcaggccta gactcccgag 120
gcttctcttt tggcccttcc ctggcccagg agcttggact gggctgcgtg ctcatccgaa 180
agcgggggaa gctgccaggc cccactctgt gggcctccta ttccctggag tacgggaagg 240
ctgagctgga gattcagaaa gacgccctgg agccaggaca gaggttggtc gtcgtggatg 300
atctgctggc cactggtgga accatgaacg ctgccigtga gctgctgggc cgcctgcagg 360
ctgaggctct ggagtgcgtg agccctgggtg agctgacctc gcttaa 406
```

<210> 27

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on AK

<400> 27

ctgcaccggt tattagccag ttctacaagg aatcattgat gaaagttaag ccttatgttg 60
atatactttt tggaaatgag acagaagctg ccacttttgc tagagagcaa ggctttgaga 120
ctaaagacat taaagagata gccaaaaaga cacaagccct gccaaagatg aactcaaaga 180
ggcagcgaat cgtgatcttc acccaaggga gagatgacac tataatggct acagaaagtg 240
aagtcactgc ttttgcctgc ttggatcaag accagagaga aattattgat accaatggag 300
ctggagatgc atttgttggg ggttttctgt ctcaactggt ctctgacaag ccactgactg 360
aatgtatcc 369

<210> 28

<211> 317

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on ERCC1

<400> 28

tgatacccct cgacgaggat gaggtccctc ctggagtggc caagccccta ttccgatcta 60
cacagagcct tcccactgtg gacacctcgg cccaggcggc ccttcagacc tacgccgaat 120
atgccatctc acagcctctg gaaggggctg gggccacgtg cccacaggg tcagagcccc 180

tggcaggaga gacgccaac caggccctga aaccggggc aaaatccaac agcatcatig 240
tgagccctcg gcagaggggc aatcccgtag tgaagttcgt gcgcaacgtg ccctgggaat 300
ttggcgacgt aattccc 317

<210> 29

<211> 391

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on UDG

<400> 29

atctggccca gaaattaggg ctcaatttcc tgattgtagt agaggttaag attgctgtga 60
gctttatcag ataagagacc gagagaagta agctgggtct tgttattcct tgggtgttgg 120
tggaataagc agtggaattt gaacaaggaa gaggagaaaa gggaattttg tcittatggg 180
gtgggggtgat tttctcctag ggttatgtcc agtgggggtt ttttaaggcag cacagacigc 240
caagtactgt tttttttaac cgactgaaat cactttggga tattttttcc tgcaacactg 300
gaaagtttta gttttttaag aagtactcat gcagatatat atatataat ttttccagat 360
ccttttttta agagacgggc tttattgggt c 391

<210> 30

<211> 410

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on PARP

<400> 30

```
aaggcgaatg ccagcggtac aagcccttta agcagcttca taaccgaaga ttgctgiggc 60
acgggtccag gaccaccaac ttgctggga tctgtccca gggcttcgg atagccccgc 120
ctgaagcgcc cgtgacaggc tacatgtttg gtaaagggat ctatttcgt gacatggcti 180
ccaagagtgc caactaciac catacgtctc agggagaccc aataggctta atcctgttgg 240
gagaagtigc ccttggaac atgtatgaac tgaagcacgc ttcacatac agcaggttac 300
ccaagggcaa gcacagtgc aaaggtttgg gcaaaactac ccctgacct tcagciaaca 360
ttagtctgga tggigttagc gttctcttg ggaccgggat ttcatttggt 410
```

<210> 31

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on LIG1

<400> 31

```
actggcagtg ctccacagc caagaagata gacatcatca aaggcccttt tgtggcctgc 60
cgccactcag aagcccgggt catcgctagg tccctgagcg gacggctgcg ccttgggctg 120
gcagagcagt cgggtgctggc tgcctcttcc caggcagtga gccacagcc cccggggcaa 180
gaattccac cagccaiggt ggaatgctggg aagggaaga cagcagaggc cagaaagacg 240
tggctggagg agcaaggcat gatcctgaag cagacgttct gcgaggttcc cgacctggac 300
cgaattatc 309
```

<210> 32

<211> 355

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on LIG3

<400> 32

```
caaggctggcc cactttaagg actacattcc ccaggctttt cctggggggc acagcatgat 60
cttggattct gaagtgttc tgattgacaa caagacaggc aaaccactgc ccttggggac 120
tcggggagta cacaagaaag cagccttcca ggaatgcta gctgcctgt ttgttttga 180
ttgtatctac tttaatgatg tcagcttgat ggacagacct ctgtgtgagc ggcggaagtt 240
tcitcatgac aacatggttg aaaticcaaa ccgatcatg ttctcagaaa tgaagcgagt 300
cacaaaagct ttggacttgg ctgacatgat aaccgggtg atccaggagg gattg 355
```

<210> 33

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on LIG4

<400> 33

```
ggcatctggt aagctcgcat ctaa cacct ttatataggt ggtgatgatg aaccacaaga 60
aaaaaagcgg aaagctgccc caaagatgaa gaaagttatt ggaattattg agcacttaaa 120
agcacctaac cttaactaac ttaacaaaat ttctaataata ttigaagatg tagagitttg 180
tgttatgagt ggaacagata gccagccaaa gcctgacctg gagaacagaa ttgcagaatt 240
tggtggttat atagtacaaa atccaggccc agacacgtac tgtgtaattg cagggtctga 300
gaacatcaga gtgaaaaaca taattttgtc aaataaacat gatgttgtca agcctgcatg 360
gcttttagaa tgttttaaga ccaaagctt tgtaccatgg cagcctcgct t          411
```

<210> 34

<211> 335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on POLB

<400> 34

```
cgccatgagc aaacggaagg cgccgcagga gactcicaac gggggaatca ccgacatgct 60
cacagaactc gcaaactttg agaagaacgt gagccaagct atccacaagt acaatgccta 120
cagaaaagca gcatctgita tagcaaaaata cccacacaaa ataaagagtg gagctgaagc 180
taagaaattg cctggagtag gaacaaaaat tgcigaaaag attgatgagt ttttagcaac 240
tgaaaaatta cgtaacttgg aaaagattcg gcaggaigat acgagttcat ccatcaattt 300
cctgactcga gttagtggca ttggtccatc tgcctg                                     335
```

<210> 35

<211> 262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on POLD

<400> 35

```
ccaccttcac ccgtatcatg gaccccgacg tgatcacggg ttacaacatc cagaacttcg 60
accttccgta cctcatctct cgggcccgaga cctcaaggt acaaacattc cctttccctg 120
gccgigtggc cggcctttgc tccaacatcc gggactcttc attccagtcc aagcagacgg 180
gccggcggga caccaagggt gtcagcatgg tgggccgcgt gcagatggac atgctgcagg 240
```

tgctgctgcg ggagtiacaag ct

262

<210> 36

<211> 368

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on XRCC1

<400> 36

ctgtcgccat ctgttcccaa gagacctaaa ttgccagctc caactcgtac cccagccaca 60
gccccagttc ctgcccagagc acagggggca gtgacaggca aaccccaggagg agaaggcacc 120
gagcccagac gaccccagagc tggcccagag gagctgggga agatccttca ggggtgtgta 180
gtgggtgctga gtggcttcca gaaccccttc cgctccgagc tgcgagataa ggccctagag 240
cttggggcca agtaccggcc agactggacc cgggacagca cgcacctcat ctgtgccitt 300
gccaacaccc ccaagtiacag ccaggiccta ggccctgggag gccgcatcgt gcgtaaggag 360
tgggtgct 368

<210> 37

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on TOP1

<400> 37

```
tatttcaaag cccagacgga agctcggaag cagaagagca aggaagagaa actgaaaatc 60
aaagaggaga atgaaaaatt actgaaagaa tatggattct gtattatgga taaccacaaa 120
gagaggattg ctaacttcaa gatagagcct cctggacttt tccgtggccg cggcaaccac 180
cccaagaatg gcatgctgaa gagacgaatc atgcccagg atataatcat caactgtagc 240
aaagaigcca aggttccctc tcctcttcca ggacataagt ggaaagaagt ccggcatgat 300
aacaaggtta ctggcttgtt ttcc                                     324
```

<210> 38

<211> 265

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on MDR1

<400> 38

```
tcagttacc atctcgaaaa gaagtaaga tctgaaggg tctgaacctg aaggigcaga 60
gtgggcagac ggtggccctg gttggaaaca gtggctgttg gaagagcaca acagtccagc 120
```

tgaigcagag gcictaigac cccacagagg ggaiggtcag tgttgaigga caggatatta 180
ggaccataaa tgtaagggtt ctacgggaaa tcaitgggtg ggtgagtcag gaacctgtat 240
tgttigccac cacgatagct gaaaa 265

<210> 39

<211> 256

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on ENT1

<400> 39

tcagccaggg aaaaccgaga acaccatcac catgacaacc agtcaccagc ctccaggacag 60
atacaaagct gtctggctta tcttcttcat gctgggtctg ggaacgctgc tcccgiggaa 120
ttttttcatg acggccactc agtatcttac aaaccgcctg gacatgtccc agaattgtgc 180
cttggctact gctgaactga gcaaggacgc ccaggcgtca gccgcccctg cagcaccctt 240
gcctgagcgg aactct 256

<210> 40

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on MRP1

<400> 40

```
cctgttttgcg gtagatccca ggcacagcct cagtgttggc ttggtgggcc tctcagtgic 60
ttactcattg caggcacca cgtacttgaa ctggctgggt cggatgtcat ctgaaatgga 120
aaccaacatc gggccgtgg agaggctcaa ggagtattca gagactgaga aggaggcgcc 180
ctggcaaadc caggagacag ctccgccag cagtggccc cagggtggcc gattggaatt 240
ccggaactac tgcctgcgt accgagagga cctggacttc gtctcaggc acatcaatgt 300
cacgatcaat gggggagaaa aggtcggtat cgtggggcgg acgggagctg ggaagtcgtc 360
cctgacctg ggcttatttc ggatcaacga gctgcccga 399
```

<210> 41

<211> 353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on TOP2A

<400> 41

```
gtgctttttg accacgtagg ctgtttaaag aaatatgaca cgggtgttga tattctaaga 60
```

gacttttttg aactcagact taaatattat ggattaagaa aagaatggct cctaggaatg 120
cttgggtgctg aatctgctaa actgaataat caggctcgct ttatcttaga gaaaatagat 180
ggcaaaataa tcattgaaaa taagcctaag aaagaattaa ttaaagtctt gattcagagg 240
ggatatgatt cggatcctgt gaaggcctgg aaagaagccc agcaaaaggt tccagatgaa 300
gaagaaaatg aagagagtga caacgaaaag gaaactgaaa agagtgactc cgt 353

<210> 42

<211> 374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on TOP2B

<400> 42

ttacgtaagg agtggcttgt gggaatgttg ggagcagaat ctacaaagct taacaatcaa 60
gcccgtttca ttttagagaa gatacaaggg aaaattacta tagagaatag gtcaaagaaa 120
gatttgattc aaatgttagt ccagagaggi tatgaatctg acccagtga agcctggaaa 180
gaagcacaag aaaaggcagc agaagaggat gaaacacaaa accagcatga tgatagtcc 240
tccgattcag gaactccttc aggccagat ttttaattata ttttaaatat gtctctgtgg 300
tcctttacta aagaaaaagt tgaagaactg attaaacaga gagatgcaaa agggcgagag 360
gtcaatgatc ttaa 374

<210> 43

<211> 212

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on Hsp27

<400> 43

```
ctacagccgc gcgtcagcc ggcaactcag cagcggggtc tcggagatcc ggcacactgc 60
ggaaccgtgg cgcgtgtccc tggatgtcaa ccatttcgcc cggacgagc tgacggtcaa 120
gaccaaggat ggcgtggtgg agatcaccgg caagcacgag gagcggcagg acgagcatgg 180
ctacatctcc cggtgcttca cgcggaaata ca                                212
```

<210> 44

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on ENT2

<400> 44

tgaccagagg gttcagagtg ggaggcaggg ccagcccagg ccaggagcgc ctcatcttcc 60
caggccicag ccacccaggg taaaaggtag cagggaagtt gtgggcacct gagaggagga 120
acagatgtgg aggacctgag ggtgctcaaa gggccaggct cagccicaag cagtgttttc 180
attgccaaca cttactgtac ccactccgca gagccccgtt gggccitgggc ccaggggcca 240
cagctagcct gcatgtgtgt actgcacitt acagtttgca aagctcttcc ataccactc 300
tctcaccgaa gcctaattga ggc 323

<210> 45

<211> 296

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on E2F1

<400> 45

cgaatgtttc ctgtgcccig aggagaccgt aggtgggatc agccctggga agaccccatc 60
ccaggaggtc acttctgagg aggagaacag ggccactgac tctgccacca tagtgtcacc 120
accaccatca tctccccctt catccctcac cacagatccc agccagtctc tactcagcct 180
ggagcaagaa ccgctgttgt cccggatggg cagcctgcgg gctcccgtgg acgaggaccg 240
cctgtccccg ctggtggcgg ccgactcgct cctggagcat gtgcgggagg acttct 296

<210> 46

<211> 335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on p53

<400> 46

```
gctcagatag cgaaggcttg gcccctctc agcatcttat ccgagtgga ggaaatttgc 60
gtgtggagta ttggatgac agaaacacit ttcgacatag tgggtgggtg ccctatgagc 120
cgcctgaggt tggctctgac tgiaccacca tccactacaa ctacatgtgt aacagttcct 180
gcatgggcgg catgaaccgg aggcccatcc tcaccatcat cacactggaa gactccagtg 240
gtaatctact gggacggaac agctttgagg tgcgtgtttg tgcctgtcct gggagagacc 300
ggcgcacaga ggaagagaat ctccgcaaga aaggg                                     335
```

<210> 47

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on VEGFB

<400> 47

cagaggaaag tgggtgcatg gatagatgtg tatactcgcg ctacctgcca gccccgggag 60
gtgggtggc ccttgactgt ggagctcatg ggcaccgtgg ccaaacagct ggtgcccagc 120
tgcgtgactg tgcagcgtg tgggtggctg tgcctgacg atggcctgga gtgtgtgccc 180
actgggcagc accaagtccg gatgcagatc ctcatgatcc ggtacccgag cagtcagctg 240
ggggagatgt ccttggaaga acacagccag tgtgaatgc 279

<210> 48

<211> 368

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on ITGA3

<400> 48

gctgtatccc acggagatca ccgtccatgg caatgggtcc tggccctgcc gaccacctgg 60
agaccttacc aacctctca acctcactct ttctgacctt ggggacaggc catcatcccc 120
acagcgcagg cgccgacagc tggatccagg gggaggccag ggccccccac ctgtcactct 180
ggctgctgcc aaaaagcca agtcigagac tgtgctgacc tgtgccacag ggcgtgcccc 240
ctgtgtgtgg ctagagtgcc ccatccctga tgccttcgtt gtcaccaacg tgactgtgaa 300
ggcacgagtg tggaaacagc ccttcacga ggattacaga gactttgacc ggtccgggt 360
aaatggct 368

<210> 49

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on SOD2

<400> 49

```
atctgggctc caggcagaag cacagcctcc ccgacctgcc ctacgactac ggcgccctgg 60
aacctcacat caacgcgcag atcatgcagc tgcaccacag caagcaccac gcggcctacg 120
tgaacaacct gaacgtcacc gaggagaagt accaggaggc gtiggccaag ggagaigtta 180
cagcccagat agctcttcag cclgcactga agttcaatgg tggtaggtcat atcaatcata 240
gcattttctg gacaaacctc agccctaacg                               270
```

<210> 50

<211> 260

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on SOD1

<400> 50

gcctagcgag ttatggcgac gaaggccgtg tgcgigctga agggcgacgg ccagtgacag 60
ggcatcatca atttcgagca gaaggaaagt aatggaccag tgaagggttg gggaagcatt 120
aaaggactga ctgaaggcct gcatggattc catgttcatg agtttggaga taatacagca 180
ggctgtacca gtgcaggtcc tcactttaat cctctatcca gaaaacacgg tgggccaaag 240
gatgaagaga ggcatgttgg 260

<210> 51

<211> 316

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on PCNA

<400> 51

actccgccac catgttcgag gcgcgcctgg tccagggctc catcccaag aagggtgttg 60
aggcactcaa ggacctcatt aacgaggcct gctgggatat tagctccagc ggtgtaaacc 120
tgcagagcat ggactcgtcc cactctcttt tgggtcagct caccctgcgg tctgagggt 180
tcgacacctt ccgctgcgac cgcaacctgg ccatgggcgt gaacctcacc agtatgtcca 240
aaatactaaa atgcgccggc aatgaagata tcattacact aagggccgaa gataacgcgg 300
ataccttggc gctagt 316

<210> 52

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
fragment based on GAPDH

<400> 52

```
cgtcattgggt gtgaaccatg agaagtatga caacagcctc aagatcatca gcaatgcctc 60
ctgcaccacc aactgcttag caccctggc caaggctatc catgacaact ttggtatcgt 120
ggaaggactc atgaccacag tccatgccat cactgccacc cagaagactg tggatggccc 180
ctccgggaaa ctgtggcgtg atggccgcgg ggctctccag aacatcatcc ctgcctctac 240
tggcgttgcc aaggctgtgg gcaaggctat ccctgagcta gacgggaagc tcactggcat 300
ggccttccgt gtccccactg ccaacgtgtc agt                                     333
```

<210> 53

<211> 264

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on ACTB

<400> 53

```
cattggcaat gagcggttcc gctgccctga ggcactcttc cagccttcct tcctgggcat 60
ggagtcctgt ggcatccacg aaactacctt caactccatc atgaagtgtg acgtggacat 120
ccgcaaagac ctgtacgcca acacagtgtc gtcctggcggc accacatgt accctggcat 180
tgccgacagg atgcagaagg agatcacitc cctggcaccc agcacaatga agatcaagat 240
cattgctcct cctgagcgca agta                                     264
```

<210> 54

<211> 361

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed

fragment based on RSP9

<400> 54

```
tcctgggcct gaagatagag gatttcctag agagacgcct gcagaccag gtcctcaagc 60
tgggcttggc caagtcctac caccacgtc gcgtgtgat ccgccagcgc catatcaggg 120
tccgaagca ggtggigaac atccgtcct tcatgtccg cctggattcc cagaagcaca 180
ttgacttctc tctgcctct cctacggggg ttggccgcc gggccgcgtg aagaggaaga 240
atgccaagaa gggccagggt ggggctgggg ctggagacga cgaggaggag gattaagtc 300
acctgtccct cctgggctgc tggattgtct cgttttctg ccaaataaac aggatcagcg 360
```

c

361

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/32928 A2 (Phase-1 Molecular Toxicology), 10 May, 2001 (10.05.01), & AU 200114660 A	1-7
Y	SCHERF, U. et al., A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. Nat. Genet. 2000, Vol.24, No.3, pages 236 to 244	1-7
Y	TSUNODA, T. et al., Diagnosis System of drug sensitivity of cancer using cDNA microarray and multivariate statistical analysis. Frontiers Science Series 2000, Vol.30, pages 16 to 17	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 September, 2002 (18.09.02)Date of mailing of the international search report
08 October, 2002 (08.10.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06754

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GREM, J.L. et al., Thymidine kinase, thymidylate synthase, and dihydropyrimidine dehydrogenase profiles of cell lines of the National Cancer Institute'S Anticancer Frug Scteen. Clin. Cancer Res. 2001. Apr., Vol.7, No.4, pages 999 to 1009	1-7
Y	ISHIKAWA, Y. et al., Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. Clin. Cancer Res. 1999, Vol.5, No.4, pages 883 to 889	1-7
Y	SALONGA, D. et al., Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clin. Cancer Res. 2000, Vol.6, No.4, pages 1322 to 1327	1-7
Y	Takumi OCHIAI et al., "Daicho-gan ni okeru Orotate Phosphoribosyl Transferase (OPRT), Thymidine Kinase (TS), Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) no Hatsugen to CD-DST-ho (Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test) ni yoru 5-FU Kanjusei Shiken tonon Kanren ni tsuite no Kento", Gan to Kagaku Ryoho, 2001, May, Vol.28, No.5, pages 661 to 667	1-7
Y	TAKECHI, T. et al., Screening of differentially expressed genes in 5-fluorouracil-resistant human gastrointestinal tumor cells. Jpn. J. Cancer Res. 2001. Jun., Vol.92, No.6, pages 696 to 703	1-7
Y	ISHIKAWA, Y. et al., Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. Jpn. J. Cancer Res. 2000, Vol.91, No.1, p. 105-12	1-7
Y	MATA, J.F. et al., Role of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT1) in the cytotoxic action of 5[Prime]-deoxy-5-fluorouridine, an active intermediate metabolite of capecitabine, a novel oral anticancer drug. Mol. Pharmacol. 2001. Jun., Vol.59, No.6, pages 1542 to 1548	1-7


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06754

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	METZGER, R. et al., ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. J. Clin. Oncol. 1998, Vol.16, No.1, pages 309 to 316	1-7
Y	DUSSEAU, C. et al., Analysis of uracil DNA glycosylase in human colorectal cancer. Int. J. Oncol. 2001. Feb., Vol.18, No.2, pages 393 to 399	1-7
P,Y	WO 01/75160 A1 (Vysis Inc.), 11 October, 2001 (11.10.01), & AU 200189283 A	1-7
P,Y	ZEMBUTSU, H. et al., Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. Cancer Res. 2002. Jan., Vol.62, No.2, pages 518 to 527	1-7
P,Y	KIHARA, C. et al., Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. Cancer Res. 2001. Sep., Vol.61, No.17, pages 6474 to 6479	1-7
P,Y	WANG, W. et al., Pharmacogenomic dissection of resistance to thymidylate synthase inhibitors. Cancer Res. 2001. Jul., Vol.61, No.14, pages 5505 to 5510	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C12Q 1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C12Q 1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), MEDLINE (STN), JICSTファミリー (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/32928 A2 (PHASE-1 MOLECULAR TOXICOLOGY) 2001.05.10 & AU 200114660 A	1-7
Y	SCHERF, U. et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. Nat. Genet. 2000, Vol. 24, No. 3, p. 236-244	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	18.09.02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二  4B 9281 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TSUNODA, T. et al. Diagnosis system of drug sensitivity of cancer using cDNA microarray and multivariate statistical analysis. Frontiers Science Series 2000, Vol. 30, p. 16-17	1-7
Y	GREM, J. L. et al. Thymidine kinase, thymidylate synthase, and dihydropyrimidine dehydrogenase profiles of cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen. Clin. Cancer Res. 2001. Apr., Vol. 7, No. 4, p. 999-1009	1-7
Y	ISHIKAWA, Y. et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. Clin. Cancer Res. 1999, Vol. 5, No. 4, p. 883-889	1-7
Y	SALONGA, D. et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clin. Cancer Res. 2000, Vol. 6, No. 4, p. 1322-1327	1-7
Y	落合 匠 他, 大腸癌におけるOrotate Phosphoribosyl Transferase (OPRT), Thymidine Kinase (TS), Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) の発現とCD-DST法(Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test)による5-FU感受性試験との関連についての検討 癌と化学療法 2001. May, Vol. 28, No. 5, p. 661-667	1-7
Y	TAKECHI, T. et al. Screening of differentially expressed genes in 5-fluorouracil-resistant human gastrointestinal tumor cells. Jpn. J. Cancer Res. 2001. Jun., Vol. 92, No. 6, p. 696-703	1-7
Y	ISHIKAWA, Y. et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. Jpn. J. Cancer Res. 2000, Vol. 91, No. 1, p. 105-12	1-7
Y	MATA, J. F. et al. Role of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT1) in the cytotoxic action of 5[Prime]-deoxy-5-fluorouridine, an active intermediate metabolite of capecitabine, a novel oral anticancer drug. Mol. Pharmacol. 2001. Jun., Vol. 59, No. 6, p. 1542-1548	1-7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	METZGER, R. et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. J. Clin. Oncol. 1998, Vol. 16, No. 1, p. 309-316	1-7
Y	DUSSEAU, C. et al. Analysis of uracil DNA glycosylase in human colorectal cancer. Int. J. Oncol. 2001. Feb., Vol. 18, No. 2, p. 393-399	1-7
P, Y	WO 01/75160 A1 (VYSIS INC.) 2001. 10. 11 & AU 200189283 A	1-7
P, Y	ZEMBUTSU, H. et al. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. Cancer Res. 2002. Jan., Vol. 62, No. 2, p. 518-527	1-7
P, Y	KIHARA, C. et al. Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. Cancer Res. 2001. Sep., Vol. 61, No. 17, p. 6474-6479	1-7
P, Y	WANG, W. et al. Pharmacogenomic dissection of resistance to thymidylate synthase inhibitors. Cancer Res. 2001. Jul., Vol. 61, No. 14, p. 5505-5510	1-7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.